

Einfluss von Cannabinoiden auf die Migration und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

vorgelegt von:

Ellen Schmuhl,

geb. am 23.10.1980 in Dresden-Neustadt

Rostock, 2015

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz,
Institut für Toxikologie und Pharmakologie,
Universitätsmedizin Rostock,
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter G. Weiss (emer.),
Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Tierphysiologie,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 27.10.2015

Datum der Verteidigung: 10.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis mit Erläuterungen	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Humane mesenchymale Stammzellen	2
1.1.1 <i>Adipose tissue-derived stem cells</i> (ASC).....	4
1.1.1.1 ASC in vitro	5
1.2 Cannabinoide	5
1.2.1 Cannabinoid-induzierte zelluläre Effekte	7
1.2.1.1 Die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2	7
1.2.1.2 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55	8
1.2.1.3 Weitere Rezeptoren für Cannabinoide.....	10
1.2.1.4 Die MAPK-Kaskaden und die Phosphoinositid-3-Kinase	10
1.2.2 Pharmakologische Wirkungen von Cannabinoiden	12
1.2.2.1 Pharmakologische Effekte von CBD	12
1.2.2.2 Rezeptorbeteiligung bei CBD-induzierten Effekten	13
1.3 Zellmigration	14
1.3.1 Signaltransduktion.....	14
1.3.2 Homing von MSC	15
1.3.3 Zellmigration und Cannabinoide.....	15
1.4 Osteogene Differenzierung	16
1.4.1 <i>Bone remodeling</i>	16
1.4.1.1 Mechanismus der Mineralisierung und Rolle der ALP.....	17
1.4.1.2 Die Rolle des Endocannabinoidsystems beim <i>bone remodeling</i>	18
1.4.2 Effekte von Cannabinoidrezeptorliganden auf den Knochen	19
1.4.3 Induktion der osteogenen Differenzierung <i>in vitro</i>	21
1.4.4 Osteoporose	21
1.5 Zielstellung.....	22
2 Methoden	23
2.1 Isolation und Kultivierung der ASC	23
2.1.1 Isolation und CD34-Aufreinigung.....	24
2.1.2 Subkultivierung	25
2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen	25
2.1.4 Zählung und Aussaat der Zellen.....	26
2.1.5 Medien und Stimulation der Zellen	26
2.2 Migrationsanalysen	27
2.2.1 <i>Scratch Wound Healing Assay</i>	28
2.2.2 Modifizierter <i>Boyden Chamber Assay</i>	28
2.2.3 WST-1 <i>Cell Viability & Proliferation Assay</i>	29
2.3 Western-Blot-Analysen	30
2.3.1 Ernte der Zelllysate und Proteinbestimmung	30
2.3.1.1 Ernte der Volllysate	30
2.3.1.2 Aufreinigung und Aufkonzentration der Membranfraktion	30
2.3.1.3 <i>Bicinchoninic Acid Assay</i>	32
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.3.3 <i>Western Blot</i>	34
2.3.4 Immunologischer Proteinnachweis und Auswertung	35
2.3.5 Wiederverwendung der Membranen	36
2.4 Quantitative <i>Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction</i>.....	37
2.4.1 Isolierung der RNA.....	37
2.4.2 <i>Real-time RT-PCR</i>	38
2.4.2.1 TaqMan® Array Human Osteogenesis	38

2.5	<i>In vitro</i> Differenzierungsanalysen.....	41
2.5.1	Quantifizierung der Zellzahl.....	41
2.5.2	Quantifizierung der metabolischen Zellaktivität.....	42
2.5.3	Quantifizierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	42
2.5.4	Bestimmung des Kalziumgehaltes der extrazellulären Matrix	43
2.5.4.1	Alizarin-Rot-Färbung für Mikroskopie.....	43
2.5.4.2	Kresolphthalein-Komplexierung zur Quantifizierung des Kalziumgehaltes	43
2.6	Datenanalyse und Statistik.....	44
2.6.1	Normalisierung der Differenzierungsdaten	44
2.6.2	Statistische Auswertung	44
2.6.3	Darstellung der Daten	45
2.6.3.1	Darstellung der Inhibierung der CBD-induzierten Proteinexpression	46
3	Material	47
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Beeinflussung der Migration durch Cannabinoide	54
4.1.1	CBD fördert zeit- und konzentrationsabhängig die Migration von ASC	54
4.1.2	CBD steigert die Migration durch Aktivierung der ERK	56
4.1.3	CBD vermittelt seine promigrative Wirkung über GPR55 und CB ₂	58
4.1.4	Beteiligung des GPR55 und des CB ₂ bei der ERK-vermittelten Migration von ASC	61
4.1.5	PI3K und JNK sind am promigrativen Effekt von CBD beteiligt.....	64
4.1.5.1	Beeinflussung der Migration	64
4.1.5.2	Aktivierung von Akt/PKB und JNK	64
4.1.6	Zusammenfassung der CBD-Effekte auf die Migration	69
4.1.7	Das Phytocannabinoid THC wirkt ebenfalls promigrativ auf ASC	71
4.2	Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch Cannabinoide ..	74
4.2.1	Verwendung serumreduzierter Kulturbedingungen.....	74
4.2.2	CBD hemmt die Proliferation von ASC	76
4.2.3	CBD fördert die metabolische Zellaktivität von ASC	76
4.2.4	CBD fördert die osteogene Differenzierung von ASC	77
4.2.5	CBD-Effekte sind konzentrationsabhängig	78
4.2.6	Regulation osteogen-assoziiierter Gene durch CBD	79
4.2.7	Zusammenfassung der CBD-Effekte auf die osteogene Differenzierung	80
5	Diskussion	81
5.1	Migration.....	81
5.1.1	Promigrative Wirkung von CBD	81
5.1.2	Involvierung des CB ₂ und GPR55	82
5.1.3	Am promigrativen Effekt von CBD beteiligte Kinasen	84
5.1.4	Promigrative Wirkung von THC auf ASC	88
5.2	Osteogene Differenzierung	90
5.2.1	CBD hemmt die Proliferation der ASC.....	90
5.2.2	CBD fördert die metabolische Zellaktivität	90
5.2.3	CBD fördert die osteogene Differenzierung der ASC <i>in vitro</i>	91
5.3	Schlussfolgerung & Ausblick	93
6	Zusammenfassung.....	95
7	Literaturverzeichnis	i
Anhang	xvii
Selbstständigkeitserklärung	xxi
Danksagung	xxii

Abkürzungsverzeichnis mit Erläuterungen

Biologische Begriffe

AA.....	<i>ascorbic acid</i> ; Ascorbinsäure
AC	Adenylylcyclase; bildet cAMP aus ATP
ALP.....	Alkalische Phosphatase, gewebeunspezifische Form (Typ: Knochen/Leber/Niere)
AP-1	<i>activator protein 1</i> ; Transkriptionsfaktor, heterodimeres Protein bestehend aus Proteinen der c-Fos-, c-Jun-, ATF (<i>activating transcription factor</i>)- und JDP (<i>Jun dimerization protein</i>)-Familien
ASC	<i>adipose tissue-derived stem cells</i> ; multipotente Stammzellen des Fettgewebes
ATP	Adenosintriphosphat; Ribonukleosidtriphosphat
BMP.....	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i> ; temporäre Einheit, welche Osteoblasten und Osteoklasten enthält
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat; <i>second messenger</i>
CB ₁	Cannabinoidrezeptor 1
CB ₂	Cannabinoidrezeptor 2
CBL	Cannabinoidrezeptorliganden
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; der Unterscheidung und Gruppeneinteilung dienende immunphänotypische Oberflächenmarker von Zellen
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i> ; kleines GTPase Protein der Rho-Familie
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> ; Transkriptionsfaktor
CSF	<i>colony-stimulating factor</i> ; Wachstumsfaktor für hämatopoetische Stammzellen
DAG.....	1,2-Diacyl-sn-glycerin oder Diacylglycerin; Fettsäure-Ester des Glycerins
DCX.....	Doublecortin; Mikrotubuli-assoziiertes Protein im Gehirn; vom DCX-Gen kodiert
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; allgemeiner Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase 1/2</i> oder auch MAPK p42/44
ES.....	embryonale Stammzellen
FAAH.....	<i>fatty acid amide hydrolase</i> , Fettsäureamid-Hydrolase; Abbau von AEA und 2-AG
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> ; dt. Fibroblastenwachstumsfaktor
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> ; dt. γ-Aminobuttersäure; der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem
GP	β-Glycerophosphat
GPR55.....	G-protein gekoppelter Rezeptor 55
GSK-3.....	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat; Ribonukleosidtriphosphat
GUSB	β-Glucuronidase

HLA.....	humanes Leukozytenantigen; entspricht dem humanen Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
HDMEC	<i>human dermal microvascular endothelial cells</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> ; dt. insulinähnlicher Wachstumsfaktor; v. a. von Leberzellen gebildet
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IP ₃	Inositoltrisphosphat; <i>second messenger</i>
JNK.....	c-Jun N-terminale Kinase
LPI	Lysophosphatidylinositol; endogener Lipid-Ligand des GPR55
MAP2.....	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2; stabilisiert Mikrotubuli durch Quervernetzung
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK1/2.....	MAPK-Kinase 1/2; aktiviert ERK 1/2
MLCK.....	<i>Myosin light-chain kinase</i> ; reguliert u. a. Zellkontraktionsprozesse und den Zytoskeletumbau
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; dt. Boten-Ribonukleinsäure
MSC.....	mesenchymale Stammzellen
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrid
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i> ; Transkriptionsfaktor in T-Lymphozyten von Wirbeltieren
p38	MAPK p38
PDGF.....	<i>platelet-derived growth factor</i> ; potenter Wachstumsfaktor für Zellen mesenchymalen Ursprungs
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i> ; aktiviert Akt/PKB oder z. B. PKC
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A; cAMP-abhängige Serin/Threonin-Kinase
PKC	Proteinkinase C; Serin/Threonin-Kinase
PLC.....	Phosphoinositid-Phospholipase C oder Phospholipase C
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> ; kleines GTPase Protein der Rho-Familie
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i> ; MAPK-Kinase-Kinase, aktiviert MEK1/2
Ras	<i>rat sarcoma</i> ; kleines GTPase Protein
RhoA.....	<i>Ras homolog gene family, member A</i> ; kleines GTPase Protein der Rho-Familie
Spir	Mitglied der Wiscott-Aldrich <i>syndrome protein</i> (WASP) <i>homology domain 2</i> (WH2) Familie; bindet Actin und ist die Neuorganisation des Actinzytoskeletts involviert
Src	<i>Sarcoma</i> ; bezüglich Src-Tyrosinkinase
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i> ; dt. transformierender Wachstumsfaktor

TRPV1 *transient receptor potential vanilloid 1*

VEGF *vascular endothelial growth factor*; Wachstumsfaktor v. a. für Endothelzellen

Stimulanzen & Chemikalien

2-AG 2-Arachidonylglycerol; 1,3-Dihydroxypropan-2-yl-(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraensäure; Endocannabinoid

abn-CBD... abnormal-CBD; 4-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-1,3-benzenediol; Agonist am abn-CBD sensitiven Rezeptor und am GPR55

AEA Anandamid; (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(2-Hydroxyethyl)icosa-5,8,11,14-tetraenamid; Endocannabinoid

AM-251 [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazol-3-carboxamid]; Antagonist bzw. inverser Agonist am CB₁

AM-630 [(6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl) (4-methoxyphenyl)methanon]; Antagonist bzw. inverser Agonist am CB₂

APS Ammoniumperoxodisulfat

BSA Bovines Serumalbumin

Capsazepin....[N-[2-(4-Chlorophenyl) ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-enzazepin-2-carbothio-amid]; selektiver Vanilloid Rezeptor Antagonist

CBD Cannabidiol; 2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-1,3-benzenediol

CP-55940 . 2-[(1R,2R,5R)-5-Hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl) phenol; potenter Cannabinoidrezeptoragonist

DMEM *Dulbecco's modified eagle medium*; standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur

DMSO..... Dimethylsulphoxid

EDTA..... Ethylendiamintetraessigsäure

EHT1864 .. 5-(5-(7-(Trifluoromethyl)quinolin-4-ylthio)pentyl)-2-(morpholinomethyl)-4H-pyran-4-one dihydrochloride; Inhibitor der Rac-Familie GTPasen

FKS fetales Kälberserum

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; Puffersubstanz

JWH-133... (6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran; potenter, selektiver CB₂-Agonist

LY294002 . 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride]; spezifischer Inhibitor der PI3K

ML141 4-[4,5-Dihydro-5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide; Allosterischer Inhibitor von Cdc42

MTS 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

O-1602 [5-Methyl-4-[(1R,6R)-3-methyl-6-(1-cyclohexen-1-yl)-1,3-benzenediol]; Analogon des abnormal-Cannabidiols; Agonist am GPR55

O-1918 [1,3-Dimethoxy-5-methyl-2-[(1R,6R)-3-methyl-6-(1-methylethenyl)-2-cyclohexen-1-yl] benzol]; Antagonist am GPR55

PBS *phosphate buffered saline*; dt. Phosphatgepufferte Salzlösung
PD98059... 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; Inhibitor der MEK1/2
pNPP para-Nitrophenylphosphat, (4-Nitrophenyl) Dihydrogen Phosphat
PP2..... [3-(4-Chlorophenyl) 1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazol[3,4-d]pyrimidin-4-amin];
 selektiver Inhibitor der Src-Tyrosinkinasen
SB203580 . [4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl) phenyl]-1H-imidazol-4-yl] pyridin];
 selektiver MAPK p38-Inhibitor
SDS *sodium dodecyl sulphate*; dt. Natriumdodecylsulfat
SP600125 . [Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one]; ATP-kompetitiver, reversibler Inhibitor der
 JNK
TBS-T *tris-buffered saline* mit 1 % Tween® 20
TEMED Tetramethylethylendiamin
THC Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; (-)-(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-
 tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol
WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat)

Sonstige

abh..... abhängig
Ct..... *cycle of threshold*, Schwellenwertzyklus bei der RT-PCR
dest..... destilliert
ELISA *enzyme linked immunosorbent assay*; Antikörper-basiertes Nachweisverfahren
KV..... Kristallviolett-Färbung
n. s..... nicht signifikant
MW Mittelwert, arithmetischer
OD optische Dichte
OS osteogen stimulierendes Medium
PI Protease-Inhibitorcocktail
RT-PCR *reverse-transcription polymerase chain reaction*; Reverse
 Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD *standard deviation*; dt. Standardabweichung
SDS-PAGE ... SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM..... *standard error of the mean*; dt. Standardfehler
SVF..... *stromal vascular fraction*; Teil des Lipoaspirates
u. a..... unter anderem
UpM..... Umdrehungen pro Minute
US unstimulierendes Medium
VK..... Vehikelkontrolle
ZT Zimmertemperatur

1 Einleitung

Die funktionellen Inhaltsstoffe der Cannabis-Pflanze, die sog. Cannabinoide, vermitteln eine große Anzahl pharmakologischer Effekte, u. a. analgetische, antiemetische, orexigene und muskelrelaxierende Wirkungen [siehe Übersichtsartikel Pertwee und Ross, 2002]. Neuere Studien zeigen, dass das Endocannabinoidsystem mit seinen endogenen Rezeptoren und Liganden auch an Gewebeheilungsprozessen beteiligt ist [Izzo und Camilleri, 2009; Kozono *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010]. In einigen Arbeiten wurde diese cannabinoidinduzierte Regenerationsfähigkeit über Verstärkung der zellulären Migration vermittelt, z. B. bei der cornealen [Yang *et al.*, 2010] oder epithelialen [Wright *et al.*, 2005] Wundheilung. In diesem Zusammenhang wurden auch Untersuchungen zum Einfluss von Cannabinoiden auf den Knochenumbau und die Knochenregeneration durchgeführt, die nahelegen, dass Cannabinoide potentielle Arzneimittel zur Therapie von knochendegenerativen Erkrankungen wie Osteoporose darstellen [Idris *et al.*, 2005; Idris, 2010; Ofek *et al.*, 2006]. Da die Osteoporose mit 6,3 Mio Patienten allein in Deutschland (Stand 2009) [Hadjji *et al.*, 2013] die häufigste Knochenkrankung im Alter ist, besteht mit Blick auf die aktuelle demographische Entwicklung ein hoher therapeutischer Bedarf.

Die Migration und Differenzierung von *mesenchymal stem cells* (MSC) sind ebenfalls an der Geweberegeneration beteiligt [Gimble *et al.*, 2007]. Die MSC können als pluripotente Stammzellen in Zellen der anliegenden Gewebe differenzieren [Zuk *et al.*, 2001] und lösen bei allogener Transplantation keine nachweisbare Immunabwehr aus [Puissant *et al.*, 2005]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen MSC bereits das Ziel verschiedener pharmakotherapeutischer Ansätze dar, z. B. zur Behandlung von *Osteogenesis imperfecta* [Horwitz *et al.*, 1999]. Einige Studien zeigen, dass MSC gezielt in verletztes Gewebe von Myokard [Huang *et al.*, 2010], Augenepithel [Walker *et al.*, 2010] oder Knochengewebe [Granero-Moltó *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2013] einwandern. Des Weiteren verbesserte die Transplantation von *adipose tissue-derived stem cells* (ASC) die Knochenheilung in murinen Femurfraktur-Modellen [Choi *et al.*, 2011; Shoji *et al.*, 2010]. Gerade diese aus dem Fettgewebe isolierten ASC sind ein hervorragendes Werkzeug für autologe und allogene Stammzelltherapie, da sie nicht nur vielfältig differenzierbar und gut transplantierbar, sondern auch leicht zu isolieren und expandieren sind.

Eine Wirkung von Cannabinoiden auf die Aktivierung und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen stellt einen möglichen Einflussparameter bei der osteoregenerativen Wirkung von MSC dar. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss des nicht psychoaktiven Cannabinoids Cannabidiol (CBD) auf das Migrationsverhalten und die osteogene Differenzierung von humanen ASC untersucht werden.

1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Stammzellen werden hauptsächlich durch zwei Eigenschaften charakterisiert: ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihrem Potential in verschiedene Zelltypen zu differenzieren [Ren *et al.*, 2012]. Hierbei unterscheidet man multipotente MSC von pluripotenten Stammzellen, wie embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen [Yu *et al.*, 2007]. Pluripotente Zellen können zu Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) und multipotente MSC ausschließlich zu Zellen des anliegenden Gewebes differenzieren [Zuk *et al.*, 2001]. Da die Pluripotenz mit einem erhöhten Risiko der Bildung von Teratomen und Tumoren einhergeht [Fong *et al.*, 2010], erlangen die multipotenten MSC immer größeres Interesse in der biomedizinischen Forschung.

MSC, erstmalig in den 1970er Jahren von Friedenstein und Kollegen aus dem Knochenmark isoliert und beschrieben [Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1974], haben eine spindelförmige, den Fibroblasten ähnliche Morphologie (siehe Abbildung 1). Innerhalb der letzten Jahre wurden MSC aus einer Vielzahl an fetalen und adulten Geweben isoliert z. B. der Plazenta, dem Nabelschnurblut und –gewebe, dem Knochenmark, Fettgewebe, Muskeln und dem Zahnmark [siehe Übersichtsartikel Moroni und Fornasari, 2013; Seong *et al.*, 2010]. Dabei variiert die Anzahl der MSC zwischen den einzelnen Gewebetypen und Spendern [Bobis *et al.*, 2006]. Diesbezügliche Untersuchungen legen zudem eine Verringerung der Differenzierungsfähigkeit mit zunehmendem Spenderalter nahe [Stenderup *et al.*, 2003]. Im Gewebe sind MSC perivaskulär in Stammzellnischen lokalisiert [Schofield, 1978]. Diese innervierten Mikroumgebungen beinhalten neben den MSC benachbarte und differenzierte Zellen, lösliche Faktoren und extrazelluläre Matrix. Die Stammzellnische dient der Kontrolle der Selbsterneuerung sowie der Differenzierung der MSC (siehe Abbildung 2, Seite 3) [Jones und Wagers, 2008; Madrid *et al.*, 2006].

Es gibt bisher keine universellen Kriterien zur Definition von MSC, weshalb die *International Society for Cellular Therapy* einige Minimalkriterien vorgeschlagen hat [Dominici *et al.*, 2006]. Diese umfassen (I) die Adhärenz auf Zellkulturplastik unter Standardkulturbedingungen, (II) das folgende Expressionsmuster von Oberflächenmarkern: CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14- oder CD11b-, CD79- oder CD19- und HLA-DR-, und (III) die Fähigkeit der Zellen osteogen, adipogen und chondrogen zu differenzieren.

Neben den oben genannten Differenzierungswegen können MSC auch in andere Zellen mesodermalen Ursprungs differenzieren: in Muskel-, Stroma-, Sehnen-, Herzmuskel- oder Leberzellen (siehe Abbildung 2). Ferner gibt es Hinweise auf Differenzierung zu ektodermalen Zellen wie Neuronen und Epithelzellen [siehe Übersichtsartikel Caplan und Bruder, 2001].

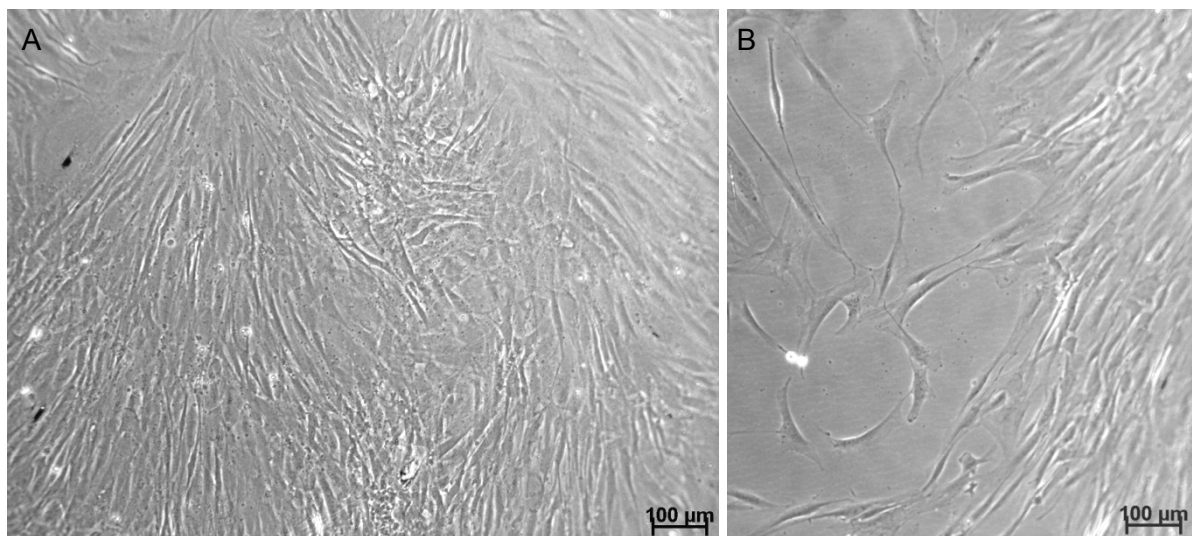


Abbildung 1: Morphologie der MSC (am Beispiel von ASC in Passage 4)

Phasenkontrastaufnahmen von konfluente Zellrasen, in dem die ASC spindelförmig und parallelorientiert wachsen (A; B, rechte Seite), und Bereichen geringerer Zelldichte (B, links), in denen die fibroblastenähnliche Morphologie der ASC zu erkennen ist.

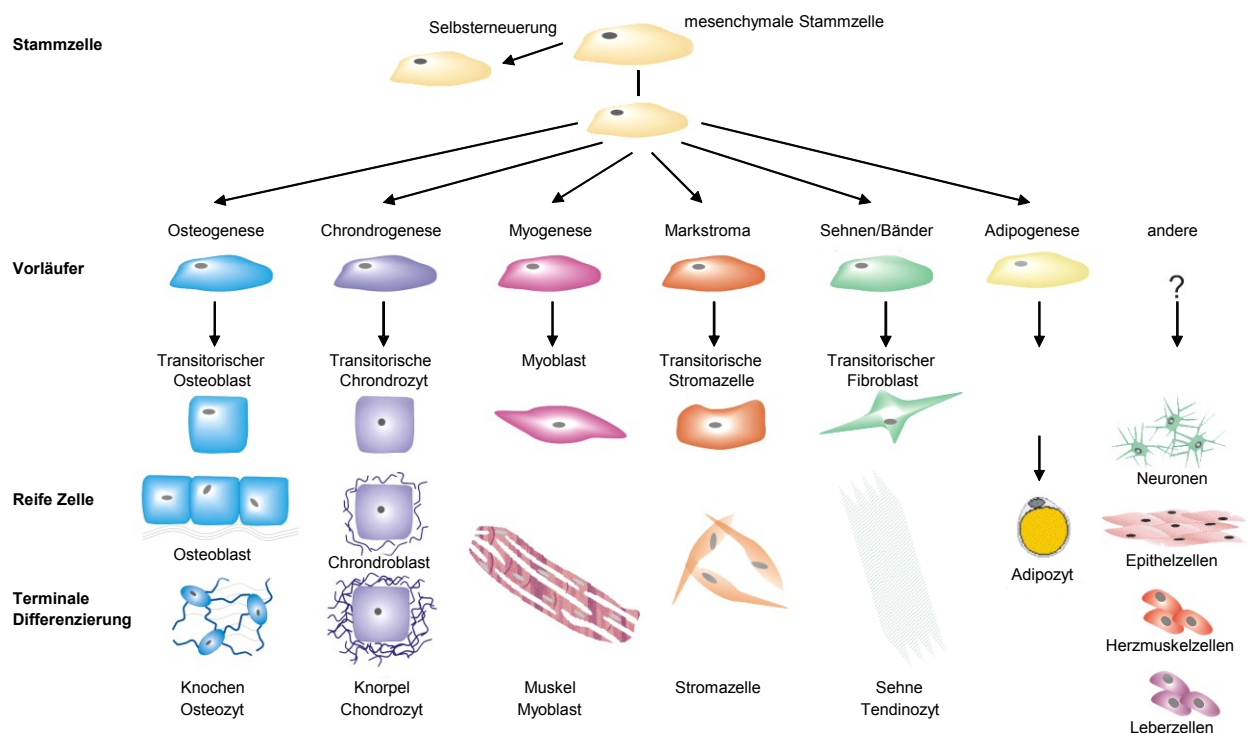


Abbildung 2: Differenzierungspotential mesenchymalen Stammzellen

Mögliche Gewebe- und Zelltypen der mesenchymalen Stammzelldifferenzierung. Die Abbildung wurde modifiziert und entnommen aus Caplan und Bruder (2001).

Auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht genau geklärt ist, fördern MSC nachweislich die Geweberegeneration [siehe Übersichtsartikel Gimble *et al.*, 2007]. Demnach können in verletztes oder erkranktes Gewebe eingewanderte MSC in die benötigten Zelltypen differenzieren und Teil des umliegenden Gewebes werden, oder durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Gewebeheilung parakrin unterstützen. Dadurch können andere MSC bzw. Vorläuferzellen rekrutiert und deren Differenzierung stimuliert werden. Des Weiteren wird vermutet, dass MSC Antioxidantien, freie Radikalfänger und Hitzeschockproteine produzieren und damit toxische Substanzen inaktivieren und das Überleben der umgebenden Zellen fördern [Gimble *et al.*, 2007]. Man nimmt an, dass dieser Prozess durch exogen zugegebene MSC verstärkt wird [Fong *et al.*, 2011]. MSC förderten bereits erfolgreich die Regeneration nach Meniskusoperationen oder verbesserten Schäden durch Ischämie nach Schlaganfällen [Li *et al.*, 2005] oder Herzinfarkten [Caplan, 2007].

Da MSC keine nachweisbaren HLA II-Antigene (humane Leukozytenantigene II) und wenig HLA I-Antigene exprimieren [Uccelli *et al.*, 2006] lösen sie bei Transplantation in einen HLA-identischen Empfänger keine Abstoßungsreaktion aus. Darüber hinaus belegen *in vitro* Experimente, dass MSC eine immunsuppressive Wirkung über Hemmung der Proliferation der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) besitzen [Puissant *et al.*, 2005]. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass MSC eines HLA-identischen Spenders, die Knochenmarkstransplantaten beigefügt wurden, die Abstoßungsreaktion minderten und das Einwachsen förderten [Lazarus *et al.*, 2005]. Therapeutische Effekte solcher Stammzelltransplantationen sind lokale Förderung angiogenetischer Prozesse, Hemmung von Narbenbildung, Förderung der Proliferation gewebspezifischer Stamm- und Vorläuferzellen sowie zytoprotektive Effekte [Caplan, 2007].

1.1.1 Adipose tissue-derived stem cells (ASC)

Das Fettgewebe ist im Vergleich zum Knochenmark eine reichhaltige und leicht zugängliche Quelle für MSC. Große Mengen Gewebe können mittels Liposuktion minimal-invasiv gewonnen werden [Gimble *et al.*, 2007]. ASC sind innerhalb des Fettgewebes vorwiegend um die Sinusoide, aber auch zwischen den Fettzellen lokalisiert [Traktuev *et al.*, 2008]. Sie haben mit den Knochenmarkstammzellen einige übereinstimmende Oberflächenmarker, ein ähnliches Genexpressionsmuster und eine vergleichbare Differenzierungskapazität [Lin *et al.*, 2008]. ASC haben folgendes Profil an Oberflächenmarkern: CD31-, CD34+, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+/-, CD146-. Sie unterscheiden sich damit in einigen Antigenen von den Endothelvorläuferzellen (CD31+), den Perizyten (CD146+) und den klassisch definierten MSC (CD34-) [Boquest *et al.*, 2005; Mizuno *et al.*, 2012; Yoshimura *et al.*, 2006]. CD34 ist ein spezieller Marker für aktivierte hämatopoetische Vorläuferzellen, aber auch ein allgemeiner Marker für undifferenzierte und vaskulär-assoziierte Zellen wie MSC [Zimmerlin *et al.*, 2013].

1.1.1.1 ASC in vitro

Die ASC sind in der *stromal vascular fraction* (SVF) des Liposuktionsgewebes enthalten (siehe 2.1, Abbildung 9, Seite 24). Die heterogene SVF enthält neben den ASC v. a. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Perizyten, Fibroblasten, Mastzellen und Präadipozyten [Gentile *et al.*, 2012]. Die Konzentration der MSC ist im Fettgewebe (5000 MSC/g Gewebe) höher als im Knochenmark (100-1000 MSC/g Gewebe) [Strem *et al.*, 2005] und variiert abhängig von Ort der Absaugung (Hüfte, Bauch oder Oberschenkel) [Jurgens *et al.*, 2008]. Das Differenzierungspotential bleibt davon unbeeinflusst [Jurgens *et al.*, 2008].

ASC exprimieren den Stammzellmarker CD34 ausschließlich kurz nach der Isolation (~60% aller Zellen der SVF) und in der folgenden Subkultivierung sinkt das Expressionslevel ab der zweiten Passage auf maximal 5% [Khosla *et al.*, 2008]. Sie haben zudem ein größeres Proliferationspotential als MSC des Knochenmarks (Verdopplungszeit von 2-5 Tagen) und bei Langzeitkultivierung einen stabilen diploiden Karyotyp [Mizuno *et al.*, 2012].

Des Weiteren können ASC *in vitro* in jeweils spezifischen Differenzierungsmedien osteogen, adipogen, chondrogen, myogen oder neurogen differenzieren [Zuk *et al.*, 2002]. Sie produzieren außerdem verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) und *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) [Mizuno *et al.*, 2012]. So gaben in entzündete oder ischämische Regionen implantierte ASC aktiv die oben genannten Wachstumsfaktoren ab und förderten die Wundheilung und Geweberegeneration [Mizuno *et al.*, 2012].

1.2 Cannabinoide

Der Hanf (*Cannabis sativa* L.) ist eine der ältesten bekannten Nutzpflanzen und stammte ursprünglich aus Zentralasien. Bisher sind über 400 chemische Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* bekannt, darunter ca. 80 Terpenphenole, welche nur in dieser Pflanze nachgewiesen wurden [Izzo *et al.*, 2009]. Diese als Phytocannabinoide bezeichneten lipophilen Phenole werden als sekundäre Pflanzenstoffe synthetisiert und akkumulieren in den Drüsenhaaren der Hanfpflanze. Die wichtigsten Phytocannabinoide sind Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und CBD. Während THC hauptsächlich für die psychoaktive Wirkung des Hanfs verantwortlich ist, stellt CBD die größte nicht psychoaktive Komponente dar. Beide Substanzen wurden in den 1960er Jahren von Raphael Mechoulam und Mitarbeitern strukturell aufgeklärt [Gaoni und Mechoulam, 1964; Marzo, 2006] (siehe Abbildung 3, Seite 6). Mittlerweile sind neben CBD auch andere schwach oder nicht psychoaktive Phytocannabinoide bekannt, z. B. Cannabinol, Cannabigerol und Cannabidivarin.

In den 1970er und 1980er Jahren wurde intensiv zu den Wirkmechanismen der Cannabinode geforscht. In der Folge wurden 1988 spezifische Bindungsstellen für THC im

Rattengehirn nachgewiesen [Devane *et al.*, 1988]. Der entsprechende Cannabinoidrezeptor 1 (CB₁) wurde 2 Jahre später kloniert [Matsuda *et al.*, 1990]. 5 Jahre später folgte die Klonierung eines weiteren Cannabinoidrezeptors, CB₂, der prädominant auf Zellen des peripheren Immunsystems und in der Milz exprimiert wird [Munro *et al.*, 1993].

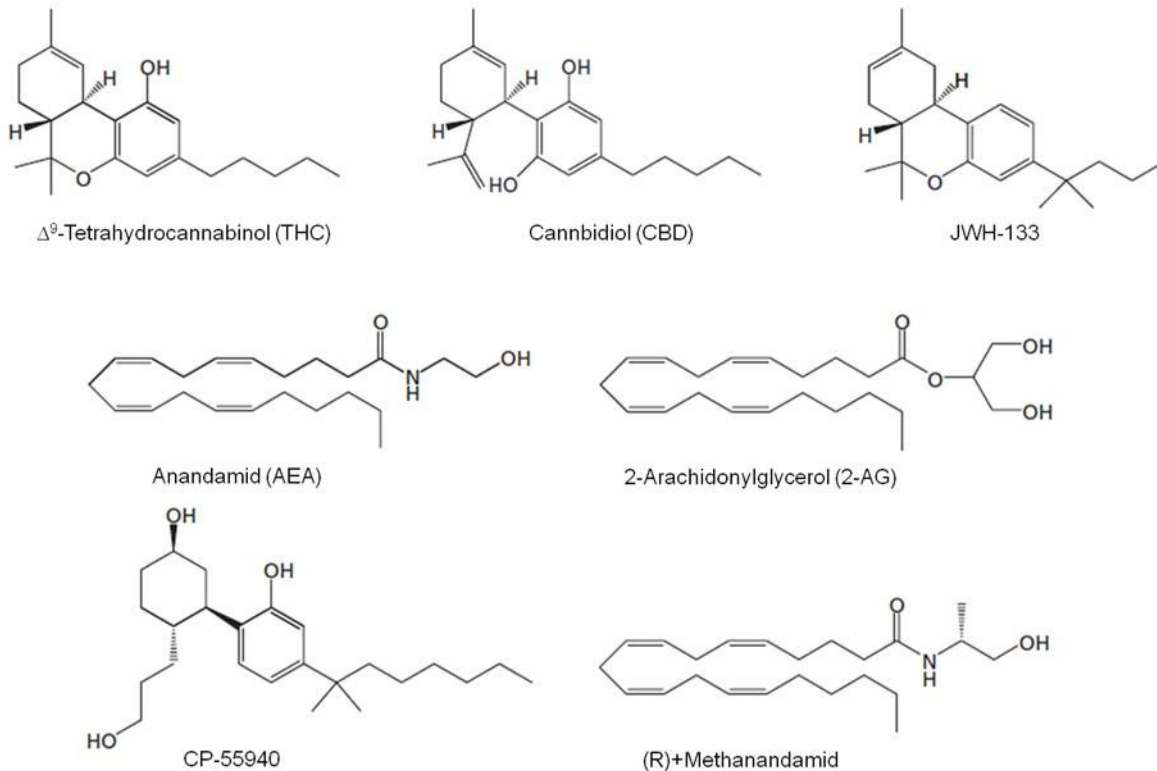


Abbildung 3: Struktur verschiedener Phytocannabinoide (THC, CBD), Endocannabinoide (AEA, 2-AG) und (semi-) synthetischer Cannabinoide.

Die Abbildungen stammen aus Oesch und Gertsch (2009).

Als erstes Endocannabinoid wurde 1992 der CB₁-Agonist N-Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA; siehe Abbildung 3) entdeckt [Devane *et al.*, 1992]. Später wurde 2-Arachidonylglycerol (2-AG; siehe Abbildung 3) als endogener Agonist an beiden Cannabinoidrezeptoren identifiziert [Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995]. Während AEA an beiden Rezeptoren als partieller bzw. schwacher Agonist fungiert, ist 2-AG an beiden Rezeptoren als Vollagonist wirksam [Howlett *et al.*, 2002]. Weitere Endocannabinoide sind beispielsweise Noladinäther (2-Arachidonylglycerylether) und Virodhamin (O-Arachidonylethanolamid). Die Endocannabinoide sind lipophile Signalmoleküle und Derivate der Arachidonsäure. Die höchste Gewebekonzentration konnte für AEA und 2-AG nachgewiesen werden. Sie werden aus Membranphospholipiden synthetisiert und hauptsächlich von der Fettsäureamid-Hydrolase (AEA, 2-AG) bzw. Monoacylglycerol-Lipase (2-AG) abgebaut [Fisar, 2009].

Neben den Phyto- und Endocannabinoiden gibt es auch eine Vielzahl synthetischer bzw. semi-synthetischer Cannabinoide (siehe Abbildung 3) wie z. B. CP-55940 (potenter Agonist am CB₁ und CB₂), R(+)-Methanandamid (hydrolysestabile Variante des Anandamid; selektiver CB₁-Agonist) oder JWH-133 (selektiver CB₂-Agonist) [Pertwee].

1.2.1 Cannabinoid-induzierte zelluläre Effekte

1.2.1.1 Die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2

Der CB₁ ist der prädominante Cannabinoidrezeptor des zentralen Nervensystems und ist dort vorwiegend in den Basalganglien und im Hypothalamus lokalisiert. Er kommt nur in geringen Mengen in peripheren Geweben wie Hypophyse, Gastrointestinal- und Reproduktionstrakt, Herz, Lunge oder Blase vor [Howlett *et al.*, 2002; Mackie, 2008]. Der CB₂ befindet sich vor allem auf den Zellen des peripheren Immunsystems (insbesondere Lymphozyten wie B-Zellen und natürliche Killerzellen), in der Milz und den Tonsillen. Im Gehirn wird der CB₂ nur von aktivierten Mikroglia und einigen Neuronentypen exprimiert [Atwood und Mackie, 2010; Liu *et al.*, 2009a]. Beide Cannabinoidrezeptoren wurden auch im Knochen nachgewiesen: CB₁ insbesondere auf symphatischen Nervenendigungen und CB₂ in den knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten [Bab *et al.*, 2008].

Bei den klassischen Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 handelt es sich um transmembranäre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des G_{i/o}-Typs, welche die Adenylylcyclase (AC)-Aktivität hemmen und via Senkung des cAMP-Spiegels die Proteinkinase A (PKA) inhibieren (siehe Abbildung 4, Seite 9) [Bosier *et al.*, 2010].

Des Weiteren phosphorylieren der aktivierte CB₁ und CB₂ die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) [Oesch und Gertsch, 2009] und Mitglieder der MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) -Familie wie die p44/42 MAPK bzw. *extracellular signal-regulated kinase-1* und -2, die p38 MAPK und die c-Jun N-terminale Kinase [Bosier *et al.*, 2010]. Diese MAPK regulieren über verschiedene Transkriptionsfaktoren (neben CREB, *cAMP-response element-binding proteins*, z. B. AP-1, *activator protein 1*) Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung. Weitere Erläuterungen zur MAPK-Kaskade und der PI3K befinden sich unter 1.2.1.4. (Seite 10).

Zusätzlich kann via CB₁ direkt eine Schließung N- und P/Q-Typen spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle oder eine Öffnung einwärts gerichteter K⁺-Kanäle auslösen (siehe Abbildung 4, Seite 9) [Howlett *et al.*, 2002]. Diese Ionenkanalmodulationen sind die Ursache der cannabinoidinduzierten Inhibierung der Neurotransmitterfreisetzung aus präsynaptischen Zellen.

Über Aktivierung der Phospholipase C-β (PLC-β) und Bildung von Inositoltriphosphat 3 (IP₃) kann CB₁ außerdem zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen

Retikulum führen [Demuth und Molleman, 2006] (weitere Erläuterungen, siehe 1.2.1.2). Es gibt auch Nachweise, dass CB₁ bei höheren Konzentrationen des Rezeptorliganden mit G_s-Proteinen interagiert, und somit in einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und weiteren Aktivierung der PKA resultiert (siehe Abbildung 4, Seite 9) [Jarrahian *et al.*, 2004].

1.2.1.2 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55

Neben dem CB₁ und CB₂ konnte mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor 55 (GPR55) ein weiterer Rezeptor mit einer hohen Affinität zu bestimmten Cannabinoiden identifiziert werden. Nachdem GPR55 erstmalig 1999 isoliert und kloniert wurde [Sawzdargo *et al.*, 1999], wurde 2007 Lysophosphatidylinositol (LPI) als endogener Lipid-Agonist nachgewiesen [Oka *et al.*, 2007]. GPR55 wird prädominant im Gehirn, der Hypophyse und den Nebennieren, aber auch auf Immunzellen und im Verdauungstrakt exprimiert [Henstridge *et al.*, 2011]. Als endogener Agonist am GPR55 konnte AEA nachgewiesen werden [Ryberg *et al.*, 2007]. Weitere Endocannabinoide als potentielle GPR55-Liganden werden derzeit noch kontrovers diskutiert [Ross, 2009; Sharir und Abood, 2010]. Unter den Phytocannabinoiden wurde THC als potenter Agonist und CBD als Antagonist am GPR55 belegt [Sharir und Abood, 2010]. Weitere Cannabinoide mit Affinität zu GPR55 sind die CBD-Analoga O-1602 (Agonist) und O-1918 (Antagonist) [Ross, 2009].

Die G-Protein-Kopplung des GPR55 verläuft ersten Untersuchungen zur Folge über G_q und G_{12/13} und eine anschließende Aktivierung der Phospholipase C (PLC), PI3K und *Ras homolog gene family member A* (RhoA) (siehe Abbildung 4, Seite 9). Die direkt [Ross, 2009] oder indirekt über die PI3K [Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008] oder RhoA [Henstridge *et al.*, 2008; Lauckner *et al.*, 2008] aktivierte PLC hydrolysiert hierbei die Membran-Komponente PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu membrangebundenem Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). Der *second messenger* IP₃ bewirkt eine Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Ca²⁺-Ionen aktivieren zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) und schließlich die Raf/MEK/ERK-Kaskade [Sharir und Abood, 2010]. Durch Bildung eines Komplexes mit dem kalziumbindenden Protein Calmodulin aktivieren Kalziumionen ebenfalls die Phosphatase Calcineurin und somit den Transkriptionsfaktor NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), was wiederum zur Genexpression von Zytokinen, wie Interleukin 2 führt und Entzündungsprozesse fördert. Außerdem kann es bei GPR55-Aktivierung zu Änderungen in der Plasmamembran und der direkten Phosphorylierung der MEK 1/2 [Kapur *et al.*, 2009] und MAPK p38 kommen [Sharir und Abood, 2010].

Funktionelle Untersuchungen belegen u. a. eine Involvierung des GPR55 in die Kontrolle von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen [Staton *et al.*, 2008], Vasorelaxierung [Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008], Tumorzellproliferation [Henstridge *et al.*, 2011], Migration von Neutrophilen [Balenga *et al.*, 2011] und Knochenresorption [Whyte *et al.*, 2009a].

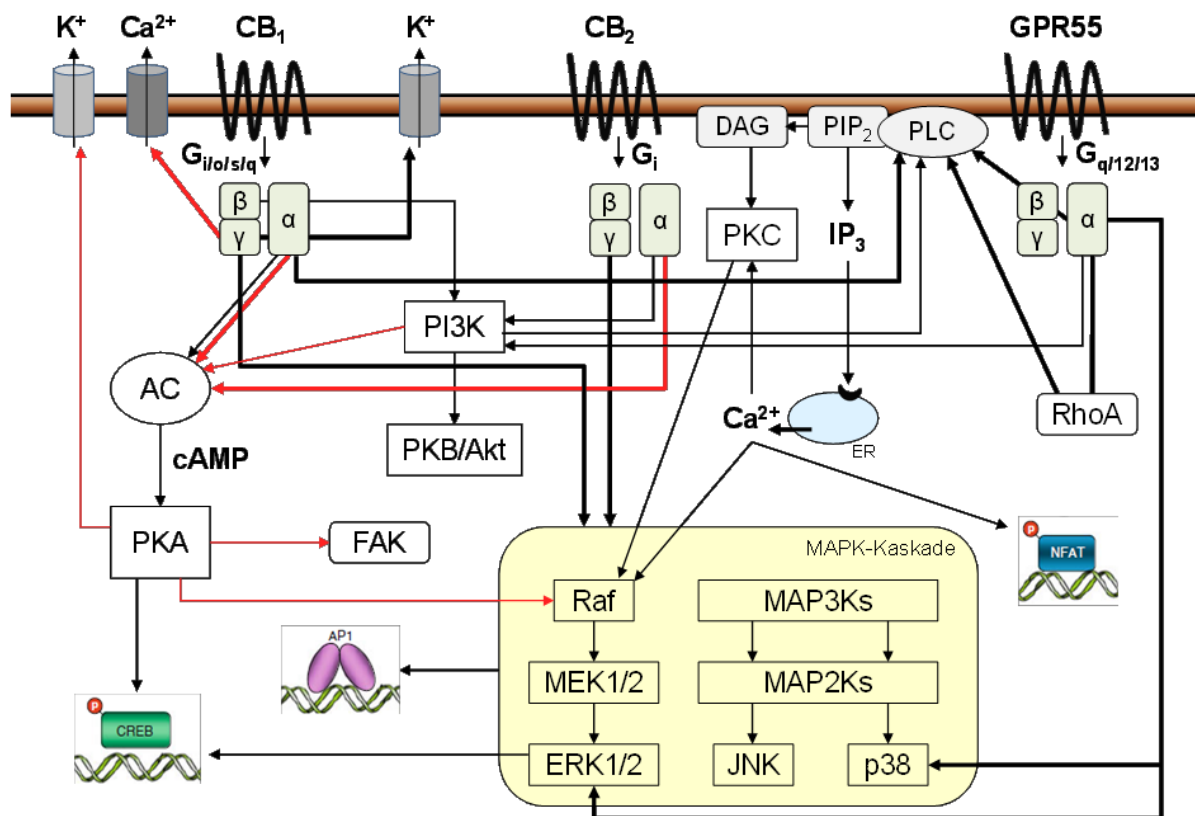


Abbildung 4: Durch Cannabinoidrezeptoren modulierte Signalwege

Bei CB₁/CB₂-Aktivierung wird vornehmlich über G_i die Adenylatcyclase (AC) gehemmt und dadurch weniger cAMP gebildet und die Proteinkinase A (PKA) und somit die Aktivierung von CREB gehemmt. Außerdem kann die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die MAPK-Kaskade aktiviert werden. Die MAPK aktivieren daraufhin eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, welche Gene regulieren die an Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündungsprozessen beteiligt sind. Über den CB₁ können zusätzlich via G_{i/o} Ca²⁺-Kanäle gehemmt und K⁺-Kanäle geöffnet, via G_s die AC aktiviert und via G_q die Phospholipase C (PLC) aktiviert und somit der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel erhöht und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden. Der GPR55 aktiviert G_q-gekoppelt direkt die PLC, oder über PI3K bzw. G_{α12/13}/RhoA, was wiederum zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ und der Aktivierung von NFAT führt. Außerdem kann die p38 und ERK 1/2 direkt über den GPR55 aktiviert werden. Zusätzlich gibt es vielfältige *Crosstalks* zwischen den einzelnen Signalwegen, was die Komplexität der Cannabinoid-Signalweiterleitung bedingt.

Pfeile: schwarz – Aktivierung, rot – Hemmung, dick – Hauptsignalwege; MAPK-Kaskade: Raf ist eine MAP3K (MAPK Kinase Kinase), MEK1/2 eine MAP2K (MAPK Kinase) und ERK1/2, JNK, p38 sind MAPK (*mitogen-activated protein kinases*); second messenger: Ca²⁺, cAMP, IP₃; Transkriptionsfaktoren: AP1, CREB, NFAT
Weitere Abkürzungen: AP1 – Aktivatorprotein 1, cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat, CREB – *cAMP response element-binding protein*, DAG – Diacylglycerin, ER – Endoplasmatisches Retikulum, ERK 1/2 – *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, FAK – *Focal adhesion kinase*, IP₃ – Inositoltrisphosphat, JNK – c-Jun N-terminale Kinase, NFAT – *Nuclear factor of activated T-cells*, PIP₂ – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKB – Proteinkinase B, RhoA – *Ras homolog gene family member A*

Abbildung wurde erstellt und modifiziert auf Grundlage von Bosier *et al.* (2010), Idris (2010), Oesch und Gertsch (2009), Ross (2009), Sharir und Abood (2010)

Als weiterer möglicher Cannabinoidrezeptor gilt der hypothetische *abnormal*-CBD-sensitive Rezeptor [Baker *et al.*, 2006]. Er vermittelt CB₁- und CB₂-unabhängige, vasodilatorische Effekte von *abnormal*-CBD (abn-CBD) und AEA [Jarai *et al.*, 1999] und konnte bisher nicht eindeutig molekular identifiziert werden. Da es mehrere Übereinstimmungen in der Pharmakologie des abn-CBD-sensitiven Rezeptors und des GPR55 gibt, wird diskutiert, ob beide Rezeptoren identisch sind. So fungieren beispielsweise die synthetischen CBD-Analoga abn-CBD und O-1602 an beiden Rezeptoren als Agonisten und CBD als Antagonist [Ross, 2009].

1.2.1.3 Weitere Rezeptoren für Cannabinoide

Cannabinoide interagieren ebenfalls mit:

- *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1), welcher durch Hitze, Wasserstoffionen und Capsaizin (Alkaloid der Chillischote) aktiviert wird und einen Ca²⁺-Influx bewirkt [Petrocellis und Marzo, 2009];
- Kernrezeptoren, den Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs), speziell PPAR_γ, wodurch u. a. antiinflammatorische Effekte [O'Sullivan und Kendall, 2010] vermittelt werden;
- Opioid-Rezeptoren im zentralen und peripheren Nervengewebe, wodurch vornehmlich die Schmerzwahrnehmung gesenkt wird [Demuth und Molleman, 2006];
- Serotonin (5-HT)₃-Rezeptoren, ligandengesteuerten Ionenkanälen, welche mit dem Gemütszustand, Schmerz und Erbrechen assoziiert sind [Greenshaw, 1993] und an dem sie eine Hemmung der 5-HT-induzierten Effekte vermitteln [Demuth und Molleman, 2006].

1.2.1.4 Die MAPK-Kaskaden und die Phosphoinositid-3-Kinase

Wie bereits oben beschrieben kontrollieren die MAPK viele komplexe Vorgänge wie die Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und den programmierten Zelltod, aber auch kurzfristige Änderungen zum Erhalt der Homöostase oder als Antwort auf hormonelle Reize [Chen *et al.*, 2001]. Dies hängt von vielen intra- und extrazellulären Faktoren ab und variiert je nach Zelltyp und Signalstärke. MAPK phosphorylieren spezifische Serin- und Threoninreste ihrer Zielsubstrate, z. B. andere Kinasen, Transkriptionsfaktoren, Phospholipasen oder Proteine des Zytoskeletts [Johnson und Lapadat, 2002].

Die drei Haupt-MAPK sind ERK (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), JNK (c-Jun N-terminale Kinase 1-3) und p38 (p38 MAPK α, β, γ, δ). Die ERK kontrolliert vorrangig Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung, wohingegen die stressaktivierten MAPK JNK und p38 neben Proliferation und Differenzierung, hauptsächlich die Apoptose und Entzündungsprozesse regulieren [Fey *et al.*, 2012]. Die Kaskaden umfassen sequentielle Phosphorylierungen, wobei die MAPK von spezifischen MAPK-Kinasen (MAP2K) und diese wiederum von MAPK-Kinasen-Kinasen (MAP3K) zweifach phosphoryliert und dadurch aktiviert werden [Kyriakis und Avruch, 2001]. Zu den MAP3K gehören die *mitogen-activated protein/ERK kinase kinases* (MEKK), die *apoptosis signaling-regulating kinases* (ASK), die

mixed lineage kinases (MLK) und die *transforming growth factor β* (TGF- β)-*activated kinase 1* – kurz TAK1 [Aikin *et al.*, 2004].

Funktionelle Interaktionen dieser Kaskaden (siehe Abbildung 5) werden auch durch die Proteinkinase B (PKB) bzw. Akt beeinflusst, welche via PDK1 (*phosphoinositide dependent kinase 1*) das Hauptaktivierungsprodukt der PI3K darstellt. Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert u. a. Apoptose, DNA-Reparaturen, Metabolismus, Proteinsynthese und Zellteilung und stimuliert die Angiogenese und Migration [Aksamitiene *et al.*, 2012]. In einem komplexen, dynamischen Geflecht beeinflussen sich alle MAPK und Akt/PKB gegenseitig, um insbesondere Proliferation, Wachstum und Apoptose der Zelle zu regulieren. Beispielsweise gibt es zahlreiche Verknüpfungspunkte zwischen der PI3K und der Raf/MEK/ERK-Kaskade. Die PI3K wirkt sich in vielen Fällen und gerade bei geringen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren positiv auf die ERK-Kaskade aus. Dadurch erleichtert sie eine maximale ERK-vermittelte Antwort auf den physiologischen Stimulus. In einem negativen Feedback hemmt aktivierte ERK wiederum den PI3K/Akt-Signalweg und somit die eigene Aktivierung [Aksamitiene *et al.*, 2012].

Es gibt innerhalb und zwischen den einzelnen Kaskaden verschiedenste Feedbacks und Crosstalks, welche in einem aktuellen Übersichtsartikel von Fey und Kollegen [Fey *et al.*, 2012] zusammengefasst wurden.

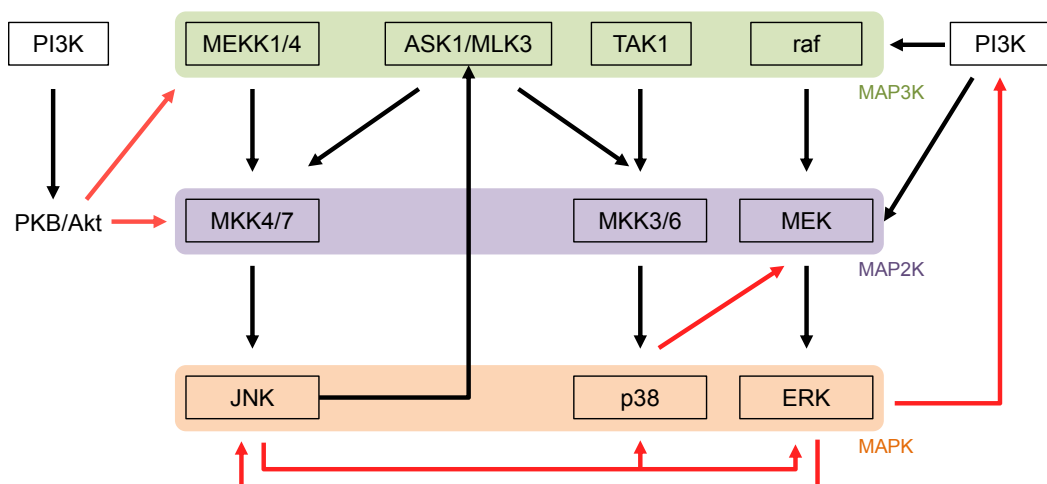


Abbildung 5: MAPK-Kaskaden mit bekannten Crosstalks, inkl. dem PI3K/Akt-Signalweg

Die Signaltransduktion erfolgt über eine Sequenz von drei Kinasen (MAP3K, MAP2K, MAPK), welche u. a. die Transkription von Genen, welche Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündung steuern, regulieren. Als Stimulus der MAP3K können u. a. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Stress und Mitogene wirken. Nähere Erläuterungen siehe Text. Pfeile: schwarz – Aktivierung, rot – Inhibition. Die Abbildung ist modifiziert und entnommen aus Fey *et al.* (2012).

1.2.2 Pharmakologische Wirkungen von Cannabinoiden

Pharmakotherapeutisch nutzbare Wirkungen Cannabinoid-basierter Arzneimittel umfassen analgetische Effekte, Hemmung der Emesis und Kachexie bei Chemotherapien, Reduktion des Augeninnendruckes bei der Glaukomtherapie und Verminderung der Spastik bei Multipler Sklerose [siehe Übersichtsartikel Howlett *et al.*, 2002; Pertwee und Ross, 2002]. Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Cannabinoide zählen vor allem psychoaktive Effekte [Abood und Martin, 1992; Howlett *et al.*, 2002].

Des Weiteren erzielen Cannabinoide immun-modulatorische Wirkungen aufgrund des hohen Expressionslevels von CB₂ auf Immunzellen [Atwood und Mackie, 2010; Costa, 2007]. Sie reichen von Entzündungshemmung bis Neuroprotektion [Cabral und Griffin-Thomas, 2009]. Außerdem gibt es Nachweise einer analgetischen Wirkung bei akuten, entzündlichen, neuropathischen bis krebsbedingten Schmerzen [Atwood und Mackie, 2010].

Therapeutische Anwendung finden Cannabinoide derzeit bei Chemotherapie-induzierter Emesis von Patienten, bei denen die Standardtherapien mit Serotonin-Antagonisten keine ausreichende Symptomlinderung bewirken. Des Weiteren ist in Deutschland seit 2011 das Arzneimittel Sativex[®], ein Mundspray, das ein 1:1 Gemisch aus den Cannabinoiden THC und CBD enthält, erfolgreich zur Behandlung der spastischen Symptome bei Patienten mit Multipler Sklerose zugelassen [Karschner *et al.*, 2011]. Das enthaltene CBD mildert u. a. die psychogene euphorische Wirkung des THC [Dalton *et al.*, 1976].

1.2.2.1 Pharmakologische Effekte von CBD

Da der klinische Einsatz von THC und anderen Cannabinoidrezeptoragonisten oft von ihren psychoaktiven Nebenwirkungen limitiert wird, sind nicht psychoaktive Cannabinoide wie CBD zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Die vielfältigen pharmakologischen Effekte von CBD wurden bereits in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst [Freimuth *et al.*, 2010; Izzo *et al.*, 2009; Mechoulam *et al.*, 2007; Mechoulam *et al.*, 2002].

CBD vermittelt u. a. antioxidative [Hamelink *et al.*, 2005], antiapoptotische [Mecha *et al.*, 2012], antiinflammatorische [Malfait *et al.*, 2000], antikonvulsive [Chesher *et al.*, 1975] antipsychotische [Zuardi *et al.*, 1995] und antiemetische Effekte [Parker *et al.*, 2006]. In anderen Studien wirkte CBD vasorelaxierend [Stanley *et al.*, 2013], anxiolytisch [Zuardi *et al.*, 1982], sedativ [Pickens, 1981], knochenstimulierend [Scutt und Williamson, 2007] und neuroprotektiv [Lastres-Becker *et al.*, 2005].

Auf Tumorzellen wirkt CBD hingegen proapoptotisch [Ramer *et al.*, 2013], antiproliferativ [Massi *et al.*, 2004], antimigrativ [Vaccani *et al.*, 2005], antiinvasiv [Ramer *et al.*, 2010] und antimetastatisch [Ramer *et al.*, 2012].

1.2.2.2 Rezeptorbeteiligung bei CBD-induzierten Effekten

CBD hat eine vergleichsweise geringe Affinität zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren 1 (K_i -Wert: 4,4 μ M bis 27,5 μ M) und 2 (K_i -Wert: 2,4 μ M bis 4,2 μ M) [Pertwee, 2008; Showalter *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2007]. Dementsprechend konnten in Versuchen mit humanen Glioblastomzellen die antimigrative [Vaccani *et al.*, 2005] und in einem Rattenmodell die neuroprotektive Wirkung [Sagredo *et al.*, 2007] von CBD als rezeptorunabhängig nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen Daten, die eine Involvierung von Cannabinoid-modulierten Rezeptoren bei CBD-Effekten nachweisen konnten wie der in einem Rattenmodell nachgewiesene über CB_1 vermittelte anxiolytischen Effekt [Do Monte *et al.*, 2013] oder der über CB_2 vermittelte antiproliferative Effekt auf humane Glioblastomzellen [Massi *et al.*, 2004].

Eine Rezeptorinvolvierung bei CBD-Effekten wird kontrovers diskutiert. Eine mögliche Erklärung stellt die Beeinflussung des AEA-abbauenden Enzyms Fettsäureamidohydrolase (FAAH) dar. In diesem Kontext konnten Hemmungen [Filippis *et al.*, 2008] sowie Aktivierungen [Massi *et al.*, 2008] der FAAH durch CBD gezeigt werden. Das Endocannabinoid AEA würde auf diese Weise langsamer bzw. schneller abgebaut werden und könnte aufgrund der längeren bzw. kürzeren extrazellulären Verfügbarkeit an den Cannabinoid-Rezeptoren die Wirkung von CBD vermitteln.

Untersuchungen zur Wirkung von CBD am TRPV1 ergaben einen EC_{50} von 3,2-3,5 μ M [Bisogno *et al.*, 2001]. Entsprechend konnte anhand eines Rattenmodells eine Involvierung von TRPV1 in den antihyperalgetischen Effekt von CBD nachgewiesen werden [Costa *et al.*, 2004]. Weitere Belege für eine Involvierung von Cannabinoid-Rezeptoren und TRPV1 bei CBD-vermittelten Effekten sind die antiinvasiven Effekte von CBD auf humane Zervix- und Lungenkarzinomzellen [Ramer *et al.*, 2010; Ramer *et al.*, 2012].

Am GPR55 fungiert CBD nach der aktuellen Datenlage als Antagonist. In einem *GTP γ S-binding*-Assay antagonisierte CBD die agonistischen Effekte von CP55940 am GPR55 mit einem IC_{50} von 445 nM [Ryberg *et al.*, 2007]. So inhibierte CBD beispielsweise die durch die GPR55-Agonisten O-1602 und LPI geförderte Funktion humaner Osteoklasten *in vitro* [Whyte *et al.*, 2009b].

1.3 Zellmigration

Die aktive Ortsänderung von Zellen bzw. Zellverbänden umfasst ungerichtete spontane sowie gerichtete chemotaktische Bewegungen. Die Zellmigration ist dabei ein komplexer mehrstufiger Prozess, der entscheidend an der Embryogenese und Geweberegeneration sowie dem Fortschreiten von Tumorerkrankungen, mentaler Retardierung, Osteoporose, Arteriosklerose und Arthritis beteiligt ist [Ridley, 2003]. Der Ablauf der einzelnen Schritte der Migration (siehe Abbildung 6, Seite 15) beginnt mit der Hinwendung der Zelle in die Richtung eines promigrativen Stimulus. Die gebildeten Ausstülpungen, Lamellipodien oder Filopodien werden von einer Polymerisierung der Actinfilamente hervorgerufen. An der mobilen vorderen Zellseite werden ständig neue Adhäsivkontakte mit der extrazellulären Matrix (ECM) ausgebildet. Die Adhäsion wird größtenteils über Integrine vermittelt, welche außen an Proteine der ECM und innen an Proteine des Zytoskeletts binden, und dabei Signale von außen in die Zelle weiterleiten. An der Zellunterseite befinden sich stabile Adhäsivkontakte, welche während der Zellbewegung als Ankerpunkte dienen und nach dem „Überschreiten“ am hinteren Ende wieder gelöst werden. Die starke Polarisierung der wandernden Zelle ist dabei komplexen Regulationsmechanismen unterworfen [Ridley, 2003].

1.3.1 Signaltransduktion

Bei der Migration spielen bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Lamellipodiums die Aktivierung von Integrinen und Proteinen bzw. Enzymen wie Rac, Cdc42 (*cell division cycle* 42), PI3K und PKC eine wichtige Rolle [Ridley, 2003]. Die kleinen GTPasen Rho, Rac, aber auch Cdc42 gehören zu der Familie der Rho-GTPasen und kontrollieren u. a. die Anordnung von Actinfilamenten in Stressfasern (Rho), Lamellipodien (Rac) oder Filopodien (Cdc42). Die Aktivierung von Rac und Cdc42 in der migrierenden Zellvorderseite hemmt die lokale Rho-Aktivität und fördert die PI3K-Aktivität. An der sich ablösenden Hinterseite der Zelle ist zum Abbau der Adhäsivkontakte v. a. die Aktivität von ERK, Src und der *focal adhesion kinase* (FAK) notwendig [Mitra *et al.*, 2005; Moissoglu und Schwartz, 2006]. Während des ganzen Prozesses der Zellmigration kommt es zu einem ständigen Auf- und Abbau von Mikrotubuli und Actinfilamenten. Die sequentielle Abfolge der Zellmigration ist in Abbildung 6 (Seite 15) dargestellt.

Auch die anderen MAPK sind an der Regulation der Zellmigration beteiligt [siehe Übersichtsartikel Huang *et al.*, 2004]: JNK v. a. durch Aktivierung mikrotubuliassoziierter Proteine (MAP) wie MAP2 [Chang *et al.*, 2003] oder DCX [Gdalyahu *et al.*, 2004] und p38 durch Neuorganisation des Actinzytoskeletts via MAPK-aktivierte Proteinkinase 2/3 und HSP-27 (Hitzeschockprotein 27) [Hedges *et al.*, 1999].

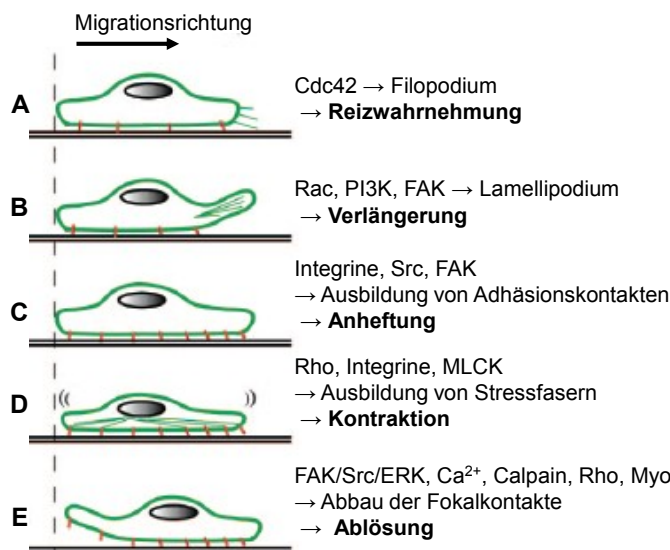


Abbildung 6: Hauptschritte der Zellmigration

Nach der Cdc42-abhängigen Wahrnehmung des Migrationsreizes durch Filopodien (A) kommt es zu einer Rac-abhängigen Verlängerung der Zelle durch Ausbildung von Lamellipodien (B). Nach der Anheftung dieser Ausstülpung an der ECM über fokale Adhäsionen (C) kontrahiert die Zelle mittels Rho-abhängig gebildeter Stressfasern (D). Abschließend kommt es zum Abbau der Adhäsionskontakte und zum Ablösen der Zellrückseite (E).

Cdc42, Rac, Rho – kleine GTPasen der Rho-Familie, MLCK - *Myosin light-chain kinase*. Die modifizierte Abbildung stammt aus Lamalice *et al.* (2007).

1.3.2 Homing von MSC

Es konnte gezeigt werden, dass Traumata die Freisetzung von MSC aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf stimulieren [Mansilla *et al.*, 2006]. Als möglicher Mechanismus wird eine Downregulation von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Stammzellen diskutiert, die über zirkulierende Zytokine und Chemokine zu einer Freisetzung von Stammzellen aus deren Nische führt [Liu *et al.*, 2009b].

In diesen komplexen Prozess, dem sog. Stammzell-*Homing* (Migrieren, Überwinden der Endothelbarriere und Einfügen ins Zielgewebe), ist eine Vielzahl von Chemokinen/Zytokinen und Adhäsionsmolekülen wie Integrine, Selektine und Chemokin-Rezeptoren involviert. Des Weiteren induzierten BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) und VEGF *in vitro* die Chemotaxis von MSC und verbesserten *in vivo* die Knochenregeneration in einem Rattenmodell, indem sie das *Homing* und die Differenzierung von Knochenmark-MSC förderten [Zhang *et al.*, 2014]. Beim *Homing* von MSC ist die Migration der Zellen ein grundlegender Bestandteil.

1.3.3 Zellmigration und Cannabinoide

Da eine Reihe der an der Regulation der Zellmigration beteiligten Kinasen (z. B. MAPK, PI3K, FAK) und kleine Rho-GTPasen als Targets über Cannabinoidrezeptoren aktiviert werden (siehe 1.2.1, ab Seite 7), ist insbesondere ein GPR55-vermittelter Cannabinoideffekt auf die Migration von MSC wahrscheinlich. Obwohl es einige Arbeiten gibt, die eine promigrative Wirkung von Cannabinoiden z. B. in humanen Kolonepithelzellen [Wright *et al.*, 2005], humanen endometrialen Stromazellen [Gentilini *et al.*, 2010] oder in der murinen osteoblastähnlichen Zelllinie MC3T3-E1 [Sophocleous *et al.*, 2011] gezeigt haben, gibt es bislang kaum Untersuchungen zum Einfluss von Cannabinoiden auf die Migration von MSC.

1.4 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung von MSC ist ein wichtiger Bestandteil des sog. *bone remodeling* (dt. Knochengeweberemodellierung), bei dem es im gesunden Menschen zu einem konstanten Auf- und Abbau von Knochengewebe kommt. Dieser komplexe Prozess umfasst die Aktivierung osteogen assoziierter Transkriptionsfaktoren (z. B. Cbfa1/RUNX2) und Proteinen (z. B. BMP-2, TGF- β , ALP, MGP, Osteopontin, Osteocalcin), welche die osteogene Differenzierung initiieren, aufrechterhalten oder auch inhibieren.

1.4.1 Bone remodeling

Das *bone remodeling* dient der Aufrechterhaltung eines funktionstüchtigen Skelettsystems, welches sich den aktuellen mechanischen Anforderungen anpassen kann. Geringes oder kein *bone remodeling* führt zu vermehrten Kalziumablagerungen und verringerter Flexibilität, was wiederum das Risiko für Knochenbrüche erhöht. Zusätzlich fungiert der Knochen als größtes Depot für Mineralien im Körper und ist wichtig für die Homöostase des extrazellulären Kalzium- und Phosphatspiegels [Bab *et al.*, 2008]. Eine komplette Erneuerung des humanen Skeletts erfolgt ungefähr alle 10 Jahre [Manolagas, 2000].

In einem ersten Schritt wird Knochengewebe von Osteoklasten durch die Bildung saurer und proteolytischer Enzyme resorbiert. Anschließend füllen Osteoblasten den entstandenen Hohlraum mit Kollagenmatrix auf, welche dann in einem nächsten Schritt mineralisiert wird [Canalis, 2009]. Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab und die Osteoblasten von MSC aus dem Knochenmark. Die Osteoblasten und -klasten gehören zu einer temporären Einheit, der sog. *basic multicellular unit* (BMU) [Manolagas, 2000] (siehe Abbildung 7, Seite 17) und können sich wechselseitig beeinflussen. So können Osteoblasten zur Steigerung der Knochenresorption den *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) auf ihrer Oberfläche exprimieren oder den *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) ausschütten. RANKL und M-CSF können an entsprechende Rezeptoren (wie *Receptor Activator of NF- κ B*, RANK) auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläufern oder reifen Osteoklasten binden und dadurch deren Entwicklung zu reifen Osteoklasten stimulieren bzw. deren resorptive Aktivität steigern (siehe auch Abbildung 8, Seite 19) [Roodman, 1999]. Des Weiteren können Osteoblasten zur akuten Hemmung der Osteoklastendifferenzierung den *decoy receptor* Osteoprotegerin (OPG) abgeben, welcher an RANKL bindet und dadurch die Interaktion von RANK und RANKL und die Aktivierung der Osteoklasten verhindert [Roodman, 1999]. Darüber hinaus stimuliert der von Osteoklasten und Osteoblasten sezernierte TGF- β (*transforming growth factor β*) die Osteoblasten und ist ein effektiver Inhibitor der Osteoklastogenese. TGF- β stellt damit einen Schlüsselregulator da, der die vorangehende Resorption mit der Neuformierung von Knochen verbindet [Roodman, 1999].

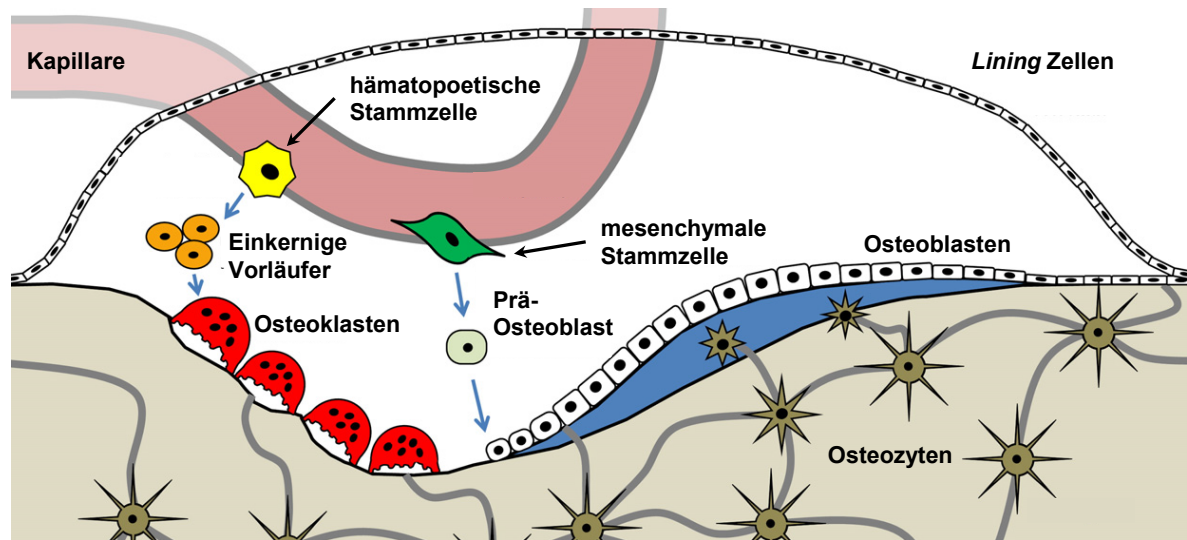


Abbildung 7: Darstellung einer BMU (basic multicellular unit)

Im intakten Knochen ist die mineralisierte Oberfläche von einem best. Osteoblastentyp, den sog. *lining cells* bedeckt. Eine Zerstörung dieser Schicht wird von den vernetzten Osteozyten registriert und diese initiieren daraufhin die Bildung einer BMU. Innerhalb der BMU resorbieren die Osteoklasten Knochengewebe (Dauer: mehrere Wochen) und die Osteoblasten synthetisieren nach vollendeter Resorption neue kollagenbasierte Matrix (Osteoid), in welche sich Kristalle einlagern können und schließlich eine mineralisierte extrazelluläre Matrix entsteht (Dauer: bis mehrere Monate). Die Versorgung mit den nötigen Vorläuferzellen erfolgt über das angeschlossene Blutgefäß. Osteoblasten, die in der Knochenmatrix eingeschlossen werden, differenzieren zu Osteozyten. Die Abbildung wurde modifiziert und basiert auf McGee-Lawrence und Westendorf (2011).

Eine Vielzahl von Proteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen sind ebenfalls an der Regulation des *bone remodeling* beteiligt [siehe Übersichtsartikel Manolagas, 2000]. So initiieren beispielsweise *bone morphogenetic proteins* (BMP), insbesondere BMP-2 und -4, die Osteoblastogenese der adulten Vorläuferzellen - den MSC. Andere Faktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), IGF und Mitglieder der *fibroblast growth factor* (FGF)-Familie können die Proliferation und Differenzierung von Zellen der Osteoblastenlinie stimulieren. Das Zytokin *tumor necrosis factor* (TNF) und das Glykoprotein *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF; CSF2) stimulieren die Osteoklastogenese, wobei Interleukine wie IL-6 und IL-11 sowohl Knochenaufbau und -abbau fördern [Huh und Lee, 2013; Manolagas, 2000; Matsumoto *et al.*, 2012].

1.4.1.1 Mechanismus der Mineralisierung und Rolle der ALP

Im letzten Schritt des Knochenaufbaus, der Biomineralisierung [siehe Übersichtsartikel Orimo, 2010], wird die von den Osteoblasten synthetisierte ECM mit Hydroxylapatit angereichert. Hierzu werden in sog. Matrixvesikeln an den Osteoblasten Hydroxylapatitkristalle gebildet. Diese Vesikel enthalten u. a. Phospholipide, Annexine, Na/Pi-Transporter, Kollagene, Enzyme, Kalzium- und Phosphationen. Die membrangebundene, gewebeunspezifische Form der Alkalischen Phosphatase (Typ: Knochen/Leber/Niere; nachfolgend mit ALP abgekürzt) hydrolysiert extrazellulär und bei niedrigem pH anorganisches Pyrophosphat zu Phosphat, welches für die Mineralisierung der ECM benötigt wird. Nach einem Transport in die Matrixvesikel wird dort aus Phosphat und

Kalzium das Hydroxylapatit gebildet, womit sich die Kristalle vergrößern und letztlich zwischen den Kollagenfibrillen der ECM eingelagert werden. Bei einem Defekt der ALP akkumulieren ihre natürlichen Substrate, hemmen die Knochenmineralisierung und verursachen die Krankheit Hypophosphatasie [Orimo, 2010]. Diese verursacht deformierte, weiche, leicht brechende Knochen, einen damit einhergehenden Minderwuchs und Probleme bei der Atmung [Orimo, 2010]. Wegen ihrer großen Bedeutung bei der Generierung von Hydroxylapatit *in vivo* sind die Aktivität der ALP und der Gehalt an Kalziumionen in der ECM gängige *in vitro* Marker der osteogenen Differenzierung.

1.4.1.2 Die Rolle des Endocannabinoidsystems beim *bone remodeling*

Im Knochen sind die Endocannabinoidkonzentrationen quantitativ vergleichbar mit denen im Gehirn, wobei AEA und 2-AG von den Osteoblasten und Osteoklasten gebildet werden [Bab *et al.*, 2008]. Des Weiteren werden die Diacylglycerol-Lipase β (DAGL β ; ist in die 2-AG-Synthese involviert) und FAAH von Osteoblasten, Osteozyten, *Lining*-Zellen und Osteoklasten produziert [Bab *et al.*, 2008]. Die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 und der GRP55 sind ebenfalls im Knochen vorhanden, wobei die Expression in den undifferenzierten Zellen geringer ist und CB₁ generell schwächer bzw. nur auf sympathischen Nervenendigungen der sympathiko-ossären Schnittstellen exprimiert wird [Idris und Ralston, 2012; Ofek *et al.*, 2006]. Darüber hinaus konnte TRPV1 ebenso in Osteoklasten und Osteoblast-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden [Idris *et al.*, 2010].

Cannabinoidrezeptorliganden stimulieren die osteogene und hemmen die adipogene Differenzierung von MSC (zusammengefasst in Abbildung 8, Seite 19) [Idris, 2011]. Sie können die Osteoblastogenese direkt, aber auch indirekt via CB₁-Rezeptoraktivierung an sympathischen Nervenendigungen fördern. Letzteres resultiert in einer Hemmung des Neurotransmitters Noradrenalin (Inhibitor der Osteoblastdifferenzierung und -funktion), der eine tonische Osteoblasteninhibition durch das sympathische Nervensystem bewirkt [Idris, 2011]. Des Weiteren induziert eine Cannabinoidrezeptoraktivierung in Osteoblasten die Expression von RANKL und die Produktion von M-CSF und Endocannabinoiden und somit die Förderung der Knochenresorption [Idris, 2011]. Ferner kann eine Cannabinoidrezeptoraktivierung auf Osteoklasten in einer Stimulation oder Hemmung der Entwicklung resultieren [Idris, 2011].

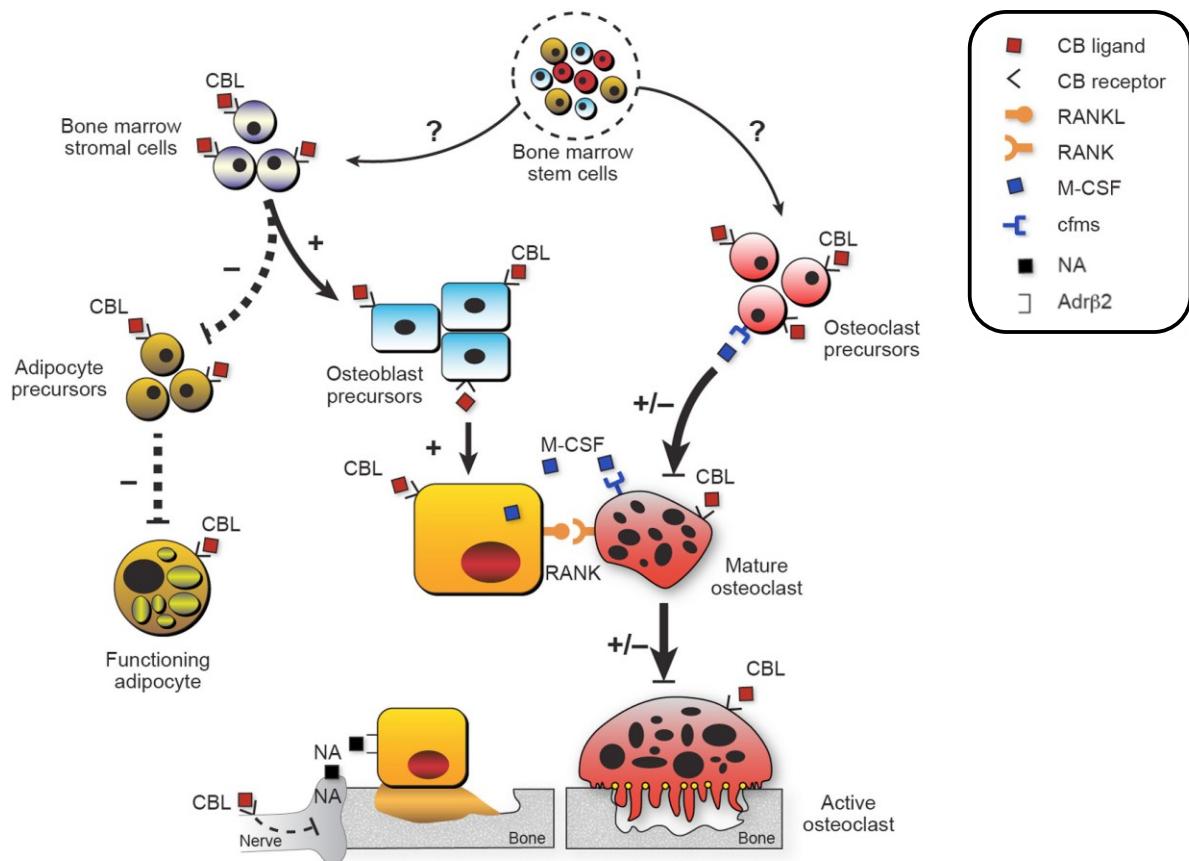


Abbildung 8: Modell zur Regulation der Differenzierung und Aktivität von Knochenzellen durch Cannabinoidrezeptorliganden

Cannabinoidrezeptorliganden (CBL) stimulieren die Proliferation, Differenzierung und Funktion von Osteoblasten über Bindung an Cannabinoidrezeptoren auf den Präosteoblasten im Knochenmark. Sie können die Osteoblastfunktion auch indirekt über eine präsynaptische Inhibition der Freisetzung von Noradrenalin (NA, Osteoblastinhibitor) fördern. Reife Osteoblasten produzieren Endocannabinoide (AEA, 2-AG) und RANKL, welche wiederum die Aktivität der Osteoklasten stimulieren. Cannabinoidrezeptorliganden können direkt an reife Osteoklasten und ihre Vorläufer binden und somit die Osteoklastformation und Knochenresorption stimulieren oder auch inhibieren. RANKL - *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*, M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor*, cfms – Rezeptor für M-CSF, Adrp2 - β 2-Adrenozeptor. Die Abbildung ist entnommen aus Idris (2011).

1.4.2 Effekte von Cannabinoidrezeptorliganden auf den Knochen

Eine Aktivierung des CB₁ fördert in jungen Jahren vornehmlich die Knochenresorption und mit zunehmendem Alter den Knochenaufbau [Idris, 2011]. Bei traumatischen Kopfverletzungen in Mäusen konnte z. B. eine periphere Osteogenesesteigerung durch Förderung der Formation von neuem Knochen gezeigt werden, welche mit einem systemischen Konzentrationsanstieg von 2-AG und einer präsynaptischen Hemmung der Freisetzung von Noradrenalin via CB₁ verbunden war [Tam *et al.*, 2008].

Betreffend des CB₂ haben Agonisten gerade im älteren Skelett eine protektive Wirkung, indem sie den Knochenaufbau begünstigen und den Knochenabbau hemmen [Bab, 2007; Sophocleous *et al.*, 2011]. Eine Reihe von Cannabinoiden (inkl. 2-AG, CBD und THC) fördern die ALP-Aktivität und Kollagensynthese in Knochenmarkzellen via CB₂-Aktivierung [Scutt und Williamson, 2007]. Außerdem induzierte der CB₂-Agonist HU-308 die osteogene

Differenzierung muriner Knochenmarkzellen und erhöhte die Anzahl differenzierter Stromazellen in Wildtypmäusen [Ofek *et al.*, 2006]. Ferner bewirkte eine CB₂-Aktivierung in humanen peridontalen Ligamentzellen eine Expressionssteigerung osteogen assoziierter Gene wie RUNX2, ALPL, Osteocalcin und Osteopontin. Parallel dazu wurden mehr mRNA-Kopien von Osteoprotegerin und weniger von RANKL nachgewiesen, was eine Hemmung der Osteoklastogenese zeigt [Qian *et al.*, 2010]. Bei einem erhöhten Knochenumbau waren hingegen CB₂-Antagonisten effektiver, da in diesem Fall via CB₂ die Osteoklastogenese gefördert wurde [Idris, 2011].

Über die Rolle des GPR55 im Knochen gibt es bisher kaum Studien. Whyte und Kollegen [Whyte *et al.*, 2009b] konnten *in vitro* eine Inhibierung der Neubildung und eine Stimulierung der Aktivität von Osteoklasten zeigen. Männliche GPR55-*Knockout*-Mäuse wiesen aufgrund einer unzureichenden Osteoklastenfunktion eine höhere Knochenmasse auf. CBD (GPR55-Antagonist) inhibierte die Osteoklastformierung *in vitro* und erhöhte die Knochendichte *in vivo*. Die Rolle des GPR55 bei der Osteoblastogenese ist derzeit noch unklar.

Der TRPV1 spielt ebenfalls eine Rolle im *bone remodeling*. Eine Studie [Idris *et al.*, 2010] zeigte für den TRPV1-Antagonisten Capsazepin eine Inhibierung der Formierung muriner Osteoklasten und einen Schutz vor Ovariectomie-induziertem Knochenschwund *in vivo*, aber auch eine Hemmung der Aktivität und Formierung von murinen Osteoblasten. Dies spricht für eine stärkere Involvement des TRPV1 in die Osteoklastogenese.

Betreffend einer Cannabinoidwirkung auf den Knochenabbau wurde für CBD auch eine Inhibierung der Knochenresorption durch Hemmung der RANK/RANKL-Expression in einem Parodontitismodell in Ratten gezeigt [Napimoga *et al.*, 2009]. Darüber hinaus inhibierte ein weiteres nicht psychoaktives Cannabinoid, die Ajulemische Säure, die Osteoklastogenese und induzierte die Apoptose reifer Osteoklasten [George *et al.*, 2008]. Eine Cannabinoidwirkung auf MSC wurde bisher nur in murinen Knochenmarkstammzellen untersucht [Gowran *et al.*, 2013]. Dabei stellten die Autoren eine CB₁-vermittelte Förderung der Überlebensrate in akuten Stresssituationen und einen negativen Einfluss von THC auf die Überlebensrate und Matrixmineralisierung fest.

Zusammenfassend zeigten die bisherigen Studien, dass gerade in jungen Jahren eine Blockade des CB₁, CB₂, GPR55 und TRPV1 die Knochenmasse erhöht bzw. vor Knochenschwund schützt, was eine potentielle Verwendung von Rezeptorantagonisten als antiosteokatabole Therapeutika nahelegt. Dabei müssen die Langzeiteffekte auf Osteoblastogenese und Knochenaufbau noch näher untersucht werden. Die positiven Befunde von CB₁- und CB₂-Agonisten, welche eine schützende Wirkung vor altersbedingtem Knochenschwund zeigten, weisen zudem auf eine Einsatzmöglichkeit von Cannabinoidrezeptor-Agonisten als osteoanabole Therapeutika hin.

1.4.3 Induktion der osteogenen Differenzierung *in vitro*

Der Einfluss von Cannabinoiden auf MSC soll in der vorliegenden Arbeit anhand eines *in vitro* Modells mit humanen ASC untersucht werden. Die osteogene Differenzierung wird *in vitro* durch die Zugabe bestimmter Stimulanzen (Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat) zum Kulturmedium induziert. Glukokortikoide sind *in vivo* in die osteogene Differenzierung involviert [Jaiswal *et al.*, 1997]. Es konnte gezeigt werden, dass das synthetische Glukokortikoid Dexamethason *in vitro* die Differenzierung von MSC zu osteoblastähnlichen Zellen induziert [Cheng *et al.*, 1994]. Auch wenn der genaue Mechanismus dieser osteogenen Induktion durch Dexamethason noch nicht geklärt ist, wurde die Expressionssteigerung des osteogen assoziierten Transkriptionsfaktors Cbfa1/RUNX2 (*core binding factor alpha 1/Runt-related transcription factor 2*) gezeigt [Viereck *et al.*, 2002]. Die im Medium enthaltene Ascorbinsäure stimuliert die Kollagensynthese aus Prokollagenen und fördert die Proliferation von verschiedene Typen von MSC [Choi *et al.*, 2008]. β -Glycerophosphat kann nach der Hydrolyse durch die ALP als Phosphationenquelle dienen. Die entstehenden mineralischen Partikel können dann in die von den Osteoblasten gebildete Kollagenmatrix eingebaut werden [Chung *et al.*, 1992].

1.4.4 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine Erkrankung des Knochens, welche mit einer Abnahme der Knochendichte und einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert ist [Canalis, 2010]. Neben einer schlechten Versorgung mit Kalzium und Vitamin D sowie Bewegungsmangel, sind vor allem sinkende Estrogen- und Testosteronspiegel die Ursache der primären altersbedingten Osteoporose - mehr als 80 % aller Osteoporose-Patienten sind postmenopausale Frauen [Hadjji *et al.*, 2013]. Ein Estrogenmangel führt zu einem verstärkten *bone remodeling*, wobei die Anzahl, Aktivität und Lebensspanne der Osteoklasten und die Anzahl der BMUs erhöht sind [siehe Übersichtsartikel Pacifici, 2008]. In der Osteoporose-Therapie wird bisher vor allem an der osteokatabolen Seite angesetzt. Potente antikatabole Therapeutika sind Estrogene, selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMS), Bisphosphonate und RANKL-Inhibitoren [Marie und Kassem, 2011]. Auf der anderen Seite gibt es mit Forsteo® nur ein zugelassenes (in Deutschland seit Ende 2003) osteoanaboles Therapeutikum. Als Wirkstoff dient ein rekombinantes Fragment des Parathyroidhormons, das Teriparatid. Das Parathyroidhormon erhöht die Zellproliferation und die lokale Produktion des osteoanabolen Wachstumsfaktors IGF und verlängert zudem die Lebensdauer der Osteoblasten [Khosla *et al.*, 2008]. Die Stabilisierung der Knochenmasse mit osteokatabolen Medikamenten ist bei knochendegenerativen Erkrankungen natürlich sinnvoll, dennoch ist es notwendig, mehr Therapien zu entwickeln, die Osteoblasten und somit den Knochenaufbau im Fokus haben.

1.5 Zielstellung

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit soll das derzeit sehr limitierte Wissen über den Einfluss von Cannabinoiden auf MSC erweitert und dadurch die Erforschung neuer cannabinoidbasierter Therapiemöglichkeiten für die Behandlung krankheitsbedingter Ungleichgewichte im Knochenumbau (z. B. Osteoporose) vorangebracht werden. Der Fokus lag dabei auf zwei Schlüsselaspekten des *bone remodeling* - der Migration und der osteogenen Differenzierung der MSC.

Daraus ergaben sich die folgenden Fragen:

1. Haben Cannabinoide eine positive Wirkung auf die Migration von ASC?
2. Welcher zelluläre Mechanismus liegt dieser Wirkung zugrunde?
3. Können Cannabinoide zum Knochenaufbau beitragen, indem sie die osteogene Differenzierung von ASC fördern?

Darauf basierend, waren die spezifischen Ziele dieser Arbeit:

- Die Analyse des Migrationsverhaltens der ASC unter Cannabinoideinwirkung
- Die Untersuchung einer möglichen Cannabinoidrezeptorbeteiligung
- Die Analyse möglicher zugrundeliegender Kinaseaktivierungen (z. B. MAPK)
- Die Durchführung von osteogenen Differenzierungsanalysen (Quantifizierung der ALP-Aktivität und Mineralisierung) nach Langzeitinkubation mit Cannabinoiden

2 Methoden

2.1 Isolation und Kultivierung der ASC

Die ASC wurden frisch aus Fettgewebe isoliert. Dieses stammte von Fettabsaugungen gesunder Menschen, welche der Verwendung ihres Liposuktionsgewebes für Forschungszwecke schriftlich zugestimmt haben. Von 107 Spendern waren 92 Frauen und 15 Männer, wobei die häufigsten Körperregionen für eine Fettabsaugung der Bauch und die Hüfte waren (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Spender

Spender	Anzahl	Alter (in Jahren)			Ort der Absaugung							
		Ø (Median)	Min	Max	Bauch	Hüfte	Ober- schenkel	Brust	Knie	Gesäß	Achsel	Nacken
alle	107	40	18	66	61	29	18	7	4	3	2	1
Frauen	92	42	21	66	54	27	18	-	4	3	2	1
Männer	15	29	18	56	7	2	-	7	-	-	-	-

Das in dieser Arbeit verwendete Fettgewebe wurde mit der Tumescenz-Vibrationstechnik entnommen. Die 1987 von Jeffrey A. Klein entwickelte Tumescenzanästhesie ist momentan die gängigste und für das Bindegewebe schonendste Methode zur Fettabsaugung. Dafür wird mindestens 0,5 l sterile Kochsalzlösung mit Medikamentenzusätzen (u. a. Schmerzmittel) über einige kleine Einstiche fächerförmig in das Gewebe eingebracht. Nach einer kurzen Einwirkungszeit wird diese mit Fettzellen angereicherte Lösung abgesaugt. Bei dem eigentlichen Absaugvorgang können noch Modifikationen vorgenommen werden. Man kann das Absaugen z. B. mit Ultraschall, einem Wasserstrahl oder Vibration unterstützen [Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006].

Das Fettgewebe wurde innerhalb von 24 h (Lagerung bei Zimmertemperatur [ZT]) nach der Absaugung zur Isolation der Stammzellen verwendet. Bei längeren Lagerungszeiten wurde eine signifikante Verringerung der Anzahl der isolierten ASC gezeigt [Carvalho *et al.*, 2011].

Ein Überblick über den weiteren Verlauf der Stammzellisolation bis zur Versuchssaussaat gibt Abbildung 9 (Seite 24). Das bei der Absaugung gewonnene Lipoaspirat besteht aus drei Phasen: flüssigem Fett (zerstörte Adipozyten), einer festeren Gewebephase (Adipozyten und vaskuläres Bindegewebe, die *stromal vascular fraction*, SVF) und einer flüssigen Phase (Kochsalzlösung mit herausgelösten Zellen und Blutzellen, v. a. Erythrozyten). Das Gewebe wird mit Kollagenase verdaut, filtriert, gewaschen, zentrifugiert und das erhaltene Pellet resuspendiert und ausgesät. Die angewachsenen Zellen der SVF werden dann nach 20-24 h mittels CD34-Magnetpartikeln aufgereinigt – die CD34-positiven Zellen stellen die in dieser Arbeit verwendeten ASC dar. Nach ca. zwei Wochen Subkultivierung werden die Zellen schließlich in Passage 4 für Versuche verwendet.

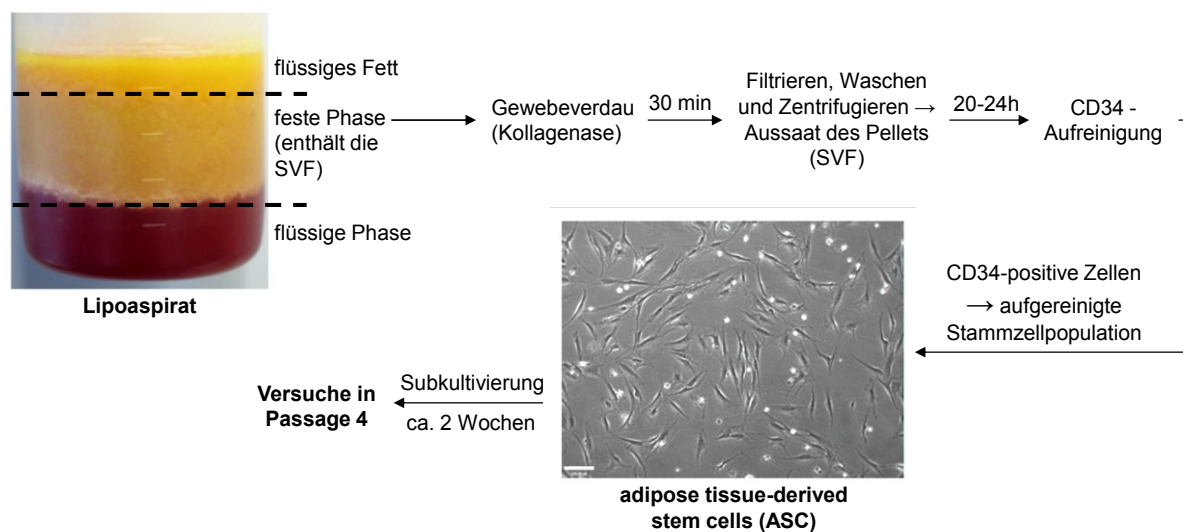


Abbildung 9: Schematische Übersicht der Stammzellisolation bis hin zur Versuchsaussaat
Nähere Erläuterungen im Text. Der Maßstabsbalken entspricht 120 µm (Foto ASC © Achim Salamon).

2.1.1 Isolation und CD34-Aufreinigung

Die vaskuläre Bindegewebsfraktion SVF enthält neben den ASC auch Präadipozyten, Vorläufer von Endothelzellen und Makrophagen. Die SVF muss als erstes isoliert werden. Dafür wurde die festere Gewebefraktion des Lipoaspirates (siehe Abbildung 9) mittels Kollagenase verdaut, anschließend filtriert, mehrmals gewaschen undb zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt neben der SVF auch noch zahlreiche Erythrozyten. Das Isolations-Protokoll ist an dem von Patricia Zuk angelehnt [Zuk *et al.*, 2001]:

1. 30 ml Gewebe mit einer 25 ml-Seropipette in ein 50 ml-Röhrchen überführen
2. Zugabe von 5 ml Kollagenase und 5 ml PBS (*phosphate-buffered saline*) → Endkonzentration der Kollagenase: 6 mg/ml
3. Verdau des Gewebes für 30 min bei 37 °C und schüttelnd mit 90–100 UpM
4. Gewebelysat über ein 100 µm-Sieb in ein neues 50 ml-Röhrchen filtrieren und für 10 min bei 400 g und ZT zentrifugieren
5. Überstand sehr vorsichtig absaugen; das Pellet in 10 ml PBS/10 % FKS (fetales Kälberserum) resuspendieren und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführen
6. Nochmals 10 min bei 400 g und ZT zentrifugieren
7. Pellet in 12 ml Vollmedium resuspendieren und auf 75 cm² aussäen → Primärkultur
8. Inkubation der Zellen unangerührt für ca. 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank

Nach 20–24 h wurden die adhärenenten Zellen der Primärkultur über das Oberflächenantigen CD34 weiter sortiert. Dieses Antigen ist charakteristisch für ASC und ermöglichte mittels CD34-Magnetbeads (Beads) deren Abtrennung von den restlichen Zellen. Das Protokoll für diese Magnetbead-basierte Zellaufreinigung ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert worden:

1. Beads waschen (Konzentration der Stammlösung: 4×10^8 Beads/ml):
 - I. pro 75 cm^2 40 μl Beads (wenn gut bewachsen, ansonsten weniger) in 5–10 ml PBS/0,1 % BSA (bovines Serumalbumin) aufnehmen
 - II. Beadsuspension in einem 15 ml-Röhrchen an den Magneten stellen
 - III. Nach 30 s Überstand absaugen und Beads in 4 ml Vollmedium aufnehmen
2. Zellen 2 x mit PBS waschen
3. Zugabe von 3 ml (pro 75 cm^2) gewaschenen Beads → sofort schwenkend verteilen
4. 5–10 min bei 37°C im Brutschrank inkubieren und kontrollieren ob genügend Beads gebunden haben (3–5 Beads pro Zelle; ansonsten mehr gewaschene Beads hinzugeben)
5. 2 x waschen mit PBS, Zugabe von 1 ml 0,25 % Trypsin (75 cm^2) und sofort schwenkend auf der Flasche verteilen
6. Bei 37°C im Brutschrank inkubieren bis sich die Zellen abgelöst haben
7. Zellen in 7 ml PBS/10 % FKS resuspendieren und in ein 15 ml-Röhrchen überführen
8. Zellen 8 min bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubieren
9. Zellen über ein $40 \mu\text{m}$ -Sieb in ein 50 ml-Röhrchen filtrieren und das Filtrat in ein 15 ml-Röhrchen überführen
10. 15 ml-Röhrchen an den Magneten stellen, nach 30 s das PBS/10 % FKS vorsichtig absaugen und Zellen sofort in 7 ml PBS/0,1 % BSA resuspendieren
11. Zellen 8 min bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubieren
12. 15 ml-Röhrchen an den Magneten stellen, nach 30 s das PBS/0,1 % BSA vorsichtig absaugen und Zellen sofort in 12 ml Vollmedium resuspendieren und auf 75 cm^2 aussäen → Passage 1

2.1.2 Subkultivierung

Die ASC wurden in Vollmedium bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert und dann in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet. ASC wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mittels Trypsin (0,25 %; 1 ml/ 75 cm^2 ; 2–3 min im Brutschrank) abgelöst und in Vollmedium (5 ml/ 75 cm^2) resuspendiert. Ohne Zentrifugationsschritt wurde die erhaltene Zellsuspension 1 : 3 auf neue Zellkulturflaschen mit bereits vorgelegtem Vollmedium (10 ml/ 75 cm^2) verteilt und schwenkend vermischt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, danach alle 2–3 Tage. Auf diese Weise wurden die ASC bis Passage 3 kultiviert, wobei jede Passage ca. 3–5 Tage benötigte. In Passage 4 wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen

Die Kryokonservierung der ASC erfolgte immer in Passage 2. Dafür wurden die ASC mittels Trypsin abgelöst, in Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 400 g und ZT zentrifugiert. Parallel dazu wurden 350 μl FKS und 150 μl DMSO (Dimethylsulfoxid) pro Kryoröhrchen vorgelegt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium pro 25 cm^2 Zellrasen resuspendiert und

jeweils 1 ml der Zellsuspension in die vorbereiteten Kryoröhrchen gegeben und vorsichtig über Kopf schwenkend vermischt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einem Einfriercontainer für 1 h bei -20 °C und 2–3 Tage bei -80 °C zwischengelagert bis sie in den Flüssigstickstoffbehälter transferiert wurden.

Zum Auftauen wurden erst 5 ml Vollmedium pro Kryoröhrchen in einem 15 ml-Röhrchen vorgelegt und erwärmt. Dann wurden die Kryoröhrchen für 30 s leicht im Wasserbad (37 °C) geschwenkt und die angetaute Zellsuspension in das vorgelegte Medium gegeben und vollständig aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 g für 5 min und ZT. Das Zellpellet wurde in je 5 ml Vollmedium resuspendiert und nochmals zentrifugiert (s. o.). Die Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1 : 3 ausgesät (siehe Subkultivierung). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.1.4 Zählung und Aussaat der Zellen

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl zur Versuchsaussaat bestimmt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Großquadraten, welche jeweils in Kombination mit dem Deckglas ein Volumen von 0,1 mm³ besitzen. Gezählt wurden die Zellen in 10 µl homogener Zellsuspension. Nach Auszählung von allen 4 Großquadraten wurde die Zellzahl pro ml berechnet (Mittelwert der gezählten Zellen pro Großquadrat multipliziert mit dem Faktor 10⁴). Die mittels Trypsin abgelösten ASC wurden in einem definierten Volumen an Vollmedium aufgenommen und daraus die Gesamtzellzahl bestimmt. Die ASC wurden für alle Versuche und Analysen (Ausnahmen: *Boyden chamber assay*, siehe 2.2.2, Seite 28) in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² und mindestens als Triplikat (Standard: Quadruplikat) in Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Vollmedium gewechselt (Ausnahme: Scratchversuche, siehe 2.2.1, Seite 28) und nach weiteren ein bis zwei Tagen, wenn Konfluenz erreicht war, gegen das jeweilige Stimulationsmedium ausgetauscht.

2.1.5 Medien und Stimulation der Zellen

Die Isolation und Subkultivierung der ASC erfolgte in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (sog. Vollmedium). In den Versuchen wurden Medien mit geringerem FKS-Gehalt verwendet: für Kurzzeitversuche bis 24 h (Ausnahme: Scratchversuche, siehe 2.2.1, Seite 28) DMEM mit 0 % FKS (0 %-Medium) und für Langzeitversuche bis 35 d DMEM mit 1–5 % FKS, da ASC eine solche Zeitspanne ohne Serumzugabe nicht überleben.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurde dem jeweiligen Medium Dexamethason (100 nM), Ascorbinsäure (25 µg/ml, \triangleq 1,42 mM) und β -Glycerophosphat (1 mM) zugegeben – dieser Mix aus Differenzierungszusätzen wurde als OS bezeichnet. Die hier eingesetzten Konzentrationen stimmen mit gängigen Literaturwerten überein [Hou *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006].

Bei Analyse der Induktion der osteogenen Differenzierung durch Cannabinoide wurde das Medium nur mit Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (kurz: AAGP) supplementiert. Diese Zusätze dienen den Zellen als Grundlage für den Aufbau einer extrazellulären Matrix, indem sie die Kollagensynthese fördern und eine Phosphatquelle liefern, ohne die eigentliche osteogene Differenzierung zu induzieren (siehe 1.4.3, Seite 21). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Tabelle 2: verwendete Medien

Bezeichnung	Penicillin/ Streptomycin (P/S) 1% v/v	FKS-Gehalt in % v/v	Ascorbin-säure - AA (25 μ g/ml)	β -Glycero- phosphat - GP (1 mM)	Dexamethason (100 nM)
Vollmedium	+	10	-	-	-
0 %-Medium	+	-	-	-	-
Medium mit OS	+	1-10	+	+	+
Medium mit AAGP	+	1-5	+	+	-

Für Kurzzeitversuche wurden die ASC einmalig und für Langzeitversuche alle 2–3 Tage stimuliert. Vor der ersten Stimulation wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Bei Western-Blot-Analysen (bis 24 h Inkubationsdauer) wurden die Zellen zusätzlich 3 h mit 0 %-Medium präinkubiert, um ihre Basalaktivität (z. B. ERK-Aktivierung) zu reduzieren. Ab der zweiten Stimulation wurde das Stimulationsmedium ohne vorheriges Waschen erneuert. Dieses Medium enthielt die Arbeitslösung der jeweiligen Stimulanz und des entsprechenden Lösungsmittels in einem Verhältnis 1 : 100. In allen Wells wurden die Lösungsmittelkonzentrationen (0,01–0,2 % v/v EtOH oder DMSO) angeglichen. Im Falle einer Vorbehandlung der Zellen mit Antagonisten, Agonisten oder Inhibitoren (Dauer: 1 h) betrug das Verhältnis Präinkubations- zu Stimulationsvolumen 1 : 5, wobei beide Medien entsprechend stärker konzentriert angesetzt wurden. Die Konzentrationen der Stamm- und Arbeitslösungen sowie die Endkonzentration im Medium von allen verwendeten Stimulanzen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: verwendete Stamm-, Arbeits- und Endkonzentrationen

Stimulanz	Lösungs- mittel (Vehikel)	Stamm- konzentration in mM	Arbeits- konzentration in PBS in μ M	Endkonzentra- tion im Medium in μ M	Lösungs- mittelkonzentration im Medium in % v/v
CBD, THC, O-1918	EtOH	30	300 (1-1000)	3 (0,01-10)	0,01
JWH-133	EtOH	3	300	3	0,1
AM-251, AM-630, Capsazepin, O-1602, SB203580, PD98059	DMSO	10	100	1	0,01
LY294002, SP600125, PP2	DMSO	5	500	5	0,1

2.2 Migrationsanalysen

Um den Einfluss der Cannabinoide auf das Migrationsverhalten der ASC zu untersuchen, wurden zwei Assays zur Analyse der Zellmigration angewendet. Der erste Assay analysiert

die „Wundheilung“ (*Scratch Wound Healing Assay*) und der zweite die Migration durch eine poren durchsetzte Membran (*Boyden Chamber Assay*). Der *Boyden Chamber Assay* wurde mit Hilfe des WST-1-Tests quantitativ ausgewertet.

2.2.1 Scratch Wound Healing Assay

In dem *Scratch Wound Healing Assay* wird das Migrationsverhalten von Zellen in einen durch den Zellrasen gezogenen Kratzer (*Scratch*) analysiert. Dafür wurden 38.000 ASC pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde mit einer sterilen 200 µl-Pipettenspitze ein gerader Kratzer durch die Mitte des Zellrasens gezogen. Um abgelöste Zellen und Zellreste zu entfernen, wurden die ASC 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Medium stimuliert. Anschließend wurde sofort ein Foto von dem Kratzer gemacht, um die Breite des Ausgangsspalt zum Zeitpunkt t_0 bestimmen zu können. Nach 18 h wurden die Spaltbreiten aller Wells mit den gleichen Mikroskop- und Kameraeinstellungen dokumentiert. Durch den direkten Vergleich zwischen den Aufnahmen von Zeitpunkt 0 h und 18 h wurde eine qualitative Aussage über das Migrationsverhalten der ASC unter verschiedenen Stimulationsbedingungen getroffen. Auf eine quantitative Auswertung (Auszählen der eingewanderten Zellen) wurde zugunsten des einfacher quantifizierbaren *Boyden Chamber Assays* verzichtet.

2.2.2 Modifizierter Boyden Chamber Assay

In einem *Boyden Chamber Assay* wird die Migration von Zellen durch eine porenbesetzte Membran zu einem Chemoattraktanten untersucht [Boyden, 1962]. Bei dem hier verwendeten modifizierten *Boyden Chamber Assay* (siehe Abbildung 10, Seite 29) dient statt dem mikroskopischen Auszählen fixierter und angefärbter Zellen WST-1 (siehe 2.2.3) zur Quantifizierung der migrierten Zellen.

Es wurden dafür BD BioCoat™ Control Inserts in 24-Well-Platten verwendet, welche inkl. Membran (Porengröße: 8 µm) aus zellkulturbehandeltem Polyethylenterephthalat (PET) bestehen. Pro Insert wurden 100.000 ASC in 0 %-Medium ausgesät, wobei das Volumen pro Insert inkl. Stimulanzien 500 µl betrug. Die Stimulation der Zellen erfolgte direkt nach Aussaat (ggf. mit 1 h Präinkubation mit Antagonisten oder Agonisten bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre). Nach einer kurzen Einwirkzeit (5 min) wurde anschließend in den unteren Teil der Kammern 750 µl Vollmedium gegeben. Das FKS im Medium fungierte dabei als Chemoattraktant, außerdem wurden so die Flüssigkeitsstände innerhalb und außerhalb des Inserts angeglichen. Ein Teil des Serums diffundiert aus der unteren Kammer in die obere, wobei dennoch ein starker Konzentrationsgradient erhalten bleibt, an dem entlang die Zellen durch die Membran wandern. Nach 2–48 h (Standardinkubationszeit: 6 h) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurden die anschließenden Schritte durchgeführt (nicht steril):

1. Jeweils 200 µl vorgewärmtes 0 %-Medium in ein freies 24-Well geben (Anzahl entspricht der n-Zahl plus mindestens 2 Blanks)
2. Medium aus den Inserts absaugen und währenddessen vorsichtig den Zellrasen von der Oberfläche schaben
3. Je 500 µl neues Medium in die Inserts geben und mit einem Wattestäbchen die Zellreste aus den Inserts entfernen → Medium gründlich absaugen
4. Zugabe von 50 µl WST zu den 200 µl Medium
5. Inserts aus den Wells nehmen und das Medium aus dem Inneren und an der Oberfläche der Membranunterseite (vorsichtig am Rand) absaugen → Inserts in die vorbereiteten Wells mit WST-Lösung hängen
6. Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ → Messung der Absorption nach 30 und 60 min bei 420–480 nm bei einer Referenzwellenlänge von mindestens 600 nm mit einem ELISA-Reader

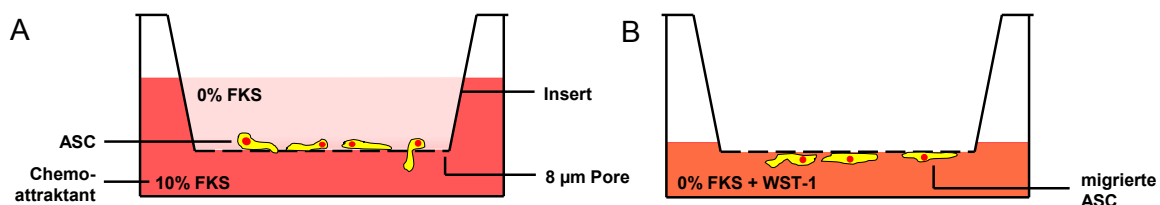


Abbildung 10: Modifizierter Boyden Chamber Assay.

A, in der hier verwendeten Boydenkammer enthält die obere Kammer bzw. Insert die ASC in 0 %-Medium und die untere Kammer Vollmedium mit 10 % FKS. Die Unterseite des Inserts besteht aus einer porendurchsetzten Membran und ermöglicht den Zellen ein Wandern zu dem Chemoattraktanten (hier: fetales Kälberserum). **B**, nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen aus dem Insert entfernt und die ASC an der Membranunterseite mittels WST-1-Test (von der Zellzahl abhängiger Farbumschlag; siehe 2.2.3) quantifiziert.

2.2.3 WST-1 Cell Viability & Proliferation Assay

Der WST-1-Assay (*water soluble tetrazolium*) nutzt den Nachweis einer intakten Atmungskette zur Bestimmung der Proliferationsrate oder Viabilität von Zellen. In lebenden Zellen setzen intakte mitochondriale Dehydrogenasen das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 in das dunkelrote Formazan um. Dabei korreliert die Intensität der Färbung direkt mit der Anzahl der viablen Zellen und kann spektralphotometrisch gemessen werden.

Für diesen Assay wurden 20.000 Zellen/Well im 96-Well-Format ausgesät. Um die Viabilität der ASC vergleichend zum *Boyden Chamber Assay* (100.000 ASC auf 500 µl 0 %-Medium; Stimulation direkt nach Aussaat; siehe 2.2.2) zu untersuchen, wurden die Zellen ebenfalls direkt nach der Aussaat stimuliert. Die ASC ballten sich jedoch in dem 0 %-Medium (keine Serumdifusion wie im *Boyden Chamber Assay*) schon nach kurzer Zeit zu einem Zellaggregat zusammen, so dass keine adäquate Auswertung möglich war. Deshalb wurden die ASC bei Versuchswiederholung erst nach einer Anwuchszeit von ~12 h in Vollmedium stimuliert. Danach folgte 1 h Präinkubation mit den jeweiligen Rezeptorantagonisten oder -agonisten oder den Kinaseinhibitoren bzw. dem Vehikel und weitere 6 h Inkubationszeit mit

dem jeweiligen Stimulanz bzw. dem Vehikel bei 37 °C und 5 % CO₂. Zum Messzeitpunkt wurde 10 µl einer erwärmten WST-1-Lösung zu den 100 µl Medium hinzugegeben und nach 20, 40 und 60 min die Absorption bei 420–480 nm mit einer Referenzwellenlänge von mehr als 600 nm an einem ELISA-Reader bestimmt. Die Normalisierung der Werte erfolgte gegen die jeweilige Vehikelkontrolle.

2.3 Western-Blot-Analysen

Bei den hier durchgeführten Western-Blot-Versuchen wurden die Proteine von Membranfraktionen oder Volllysaten von ASC mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Tank-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte eine indirekte Detektion der zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer primärer Antigen-Antikörper und sekundärer Meerrettichperoxidase-konjugierter Antikörper in einem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad).

2.3.1 Ernte der Zelllysate und Proteinbestimmung

Zur Herstellung der Volllysate wurden 192.000 ASC pro 6-Well ausgesät, nach 2-3 Tagen stimuliert, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und zum jeweiligen Messzeitpunkt geerntet. Für die Anfertigung von Membranfraktionen von ASC wurden Zellen der 4. bzw. 5. Passage verwendet und bei Erreichen der Konfluenz direkt in den 75 cm²-Zellkulturflaschen geerntet.

2.3.1.1 Ernte der Volllysate

Zum Zeitpunkt der Proteinernte wurden folgende Schritte auf Eis durchgeführt:

1. Medium absaugen, 1 x mit eiskaltem PBS waschen und gründlich absaugen
2. Zugabe von 80 µl Lysepuffer pro Well (Kralewskipuffer plus die Proteasehemmer Aprotinin, Orthovanadat, Leupeptin und Phenylmethylsulfonylfluorid; siehe 3., Tabelle 7; Seite 47) → mit einem weichen Zellschaber wurden die Zellen von der gesamten Welloberfläche abgeschabt, mit dem Lysepuffer aufgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt
3. Zum Lysieren der Zellen die Eppendorfreaktionsgefäße für 30 min auf Eis stellen und dabei mehrmals gründlich durchmischen
4. Zentrifugation der Zellen bei 4 °C und 20.000 g → Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführen (Pellet verwerfen) und davon je 10 µl für die Proteinbestimmung abnehmen
5. Lagerung der Lysate bei 4 °C (Kurzzeit 6–12 h) bzw. -20 °C (≥ 12 h)

2.3.1.2 Aufreinigung und Aufkonzentration der Membranfraktion

Die Membranfraktion wurde mittels *ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit* (Merck, Calbiochem®) aufgereinigt. In diesem differentiellen Verfahren werden selektiv

integrale Membranproteine und Membran-assoziierten Proteine basierend auf ihrer eigentlichen Assoziation mit der Zellmembran extrahiert. Außerdem sind keine Sonifizierung der Zellen oder lange Zentrifugationszeiten bei erhöhten Temperaturen notwendig [User Protocol: Native Membrane Protein Extraction Kit, Calbiochem®].

Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben für adherente Zellen. Dabei werden nach dem Waschen der Zellen in einem ersten Schritt die löslichen Membranproteine und in einem zweiten Schritt die unlöslichen Membranbestandteile extrahiert. Da sich in einer 75 cm²-Flasche mit ASC maximal 1–2 Mio. Zellen befinden, wurden die Mengenangaben der einzelnen Puffer und des Proteaseinhibitorcocktails (PI) für eine 25 cm²-Flasche verwendet:

1. Medium absaugen und Zellen 2 x mit 2 ml Waschpuffer waschen
2. Zugabe von 10 µl PI an die Flaschenwand und sofort 2 ml Extraktionspuffer 1 dazugeben → Komponenten schwenkend mischen bzw. auf dem kompletten Zellrasen verteilen → 10 min bei 4 °C leicht schwenkend inkubieren
3. Überstand gründlich absaugen und 5 µl PI an die Flaschenwand und sofort 1 ml Extraktionspuffer 2 dazugeben → Komponenten schwenkend mischen bzw. auf dem kompletten Zellrasen verteilen → 30 min bei 4 °C leicht schwenkend inkubieren
4. Den Überstand vorsichtig in Eppendorfreaktionsgefäße überführen und bei Verwendung am selben Tag bei 4 °C und ansonsten bei -20 °C lagern

Wenn sich die ASC während der 30 min Inkubationszeit mit dem zweiten Extraktionspuffer von dem Flaschenboden gelöst hatten, wurden sie anschließend mit dem Puffer in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das unlösliche Zellmaterial wurde dann bei 16.000 g für 15 min und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand (enthielt Membranfraktion) vorsichtig abgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte von einer unverdünnten Probe der Membranfraktion.

Der mittels BCA (siehe 2.3.1.3) bestimmte Proteingehalt der Membranfraktion betrug maximal 0,3 µg/µl, weswegen die Proben zusätzlich mit Microcon-Säulchen (Microcon® YM-10; Millipore) aufkonzentriert wurden. Dabei werden bis zu 500 µl einer Probe über eine wenig absorbierende Membran (nominelle Molekulargewichtsgrenze 10 kDa) zentrifugiert und dadurch die enthaltene Proteinmenge aufkonzentriert. Als erstes wurden die Microcon-Säulchen in 1,5 ml Microcon-Vials gesteckt und je 500 µl der Membranfraktion in das Probenreservoir pipettiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für 30–45 min, wobei das Restvolumen ~100 µl betrug. Danach wurden die Microcon-Säulchen umgekehrt in Eppendorfreaktionsgefäße gesteckt und die aufkonzentrierten Proben mittels 3-minütiger Zentrifugation bei 1000 g in diese überführt. Der Proteingehalt betrug anschließend ~0,9 µg/µl und somit konnten bis zu 37 µg Probe (vorher: < 12 µg) bei der SDS-Gelelektrophorese (1,5 mm Gel) aufgetragen werden.

2.3.1.3 Bicinchoninic Acid Assay

Diese Proteinbestimmungsmethode kombiniert zwei Reaktionen. Erst werden zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) durch Proteine bzw. ihre Peptidbindungen in alkalischem Medium reduziert (Biuret-Reaktion). Dabei ist die Menge an reduziertem Cu^{2+} proportional zum Proteingehalt. Anschließend geht ein Cu^{1+} -Ion mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) einen wasserlöslichen Chelatkomplex ein. Dieser violette Komplex absorbiert Strahlung bei einer Wellenlänge von 562 nm, wobei die Absorption nahezu linear mit dem Proteingehalt (20–2000 $\mu\text{g/ml}$) ansteigt [Smith *et al.*, 1985] In dieser Arbeit wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce®) zur Proteinbestimmung verwendet.

Der Albumin-Standard (enthält 2 mg/ml Rinderserumalbumin in 0,9 % Kochsalzlösung mit 0,05 % Natriumazid) wurde mit Aqua dest. 1 : 1 verdünnt und für die Erstellung der Eichgerade verwendet. Die angesetzten Standards für die Eichgerade sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Zelllysate wurden gegebenenfalls bei 4 °C aufgetaut, 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt und gut durchmischt. Anschließend wurden jeweils 10 μl der Standards und der Proben in eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standards wurden für die Eichgerade in Doppelbestimmung und die Lysate in Dreifachbestimmung aufgetragen.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Proteinstandards

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Aqua dest. (μl)	Albumin-Standard, 1 : 1 in H_2O verdünnt (μl)
1.000	0	40
800	10	40
600	20	30
400	30	20
200	40	10
100	90	10
40	240	10
20	490	10
0	40	0

Anschließend wurden in jedes Well 200 μl vom Proteinbestimmungsreagenz (50 Teile Lösung A [enthält Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid] und 1 Teil Lösung B [enthält 4 % Kupfersulfat]) pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Absorption in einem Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Mittels Eichgerade und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde der Proteingehalt der Proben in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ermittelt. Unter 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteingehalt (meist 1,0–1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden 1,5 mm und darüber 1 mm dicke Gele verwendet. Für die Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden im Folgenden die genauen Proteinmengen der einzelnen Proben auf einem Gel und innerhalb eines Versuches angeglichen. Die Zelllysate wurden mit dest. Wasser verdünnt und dann im Verhältnis 5:1 Proben- bzw. Lämmli-Puffer (Zusammensetzung siehe 3., Tabelle 7; Seite 47) hinzugegeben. Dabei betrug das Endvolumen der Proben 25 μl (1 mm-Gele) bzw. 50 μl

(1,5 mm-Gele). Direkt im Anschluss wurden alle Proben gründlich durchmischt, kurz zentrifugiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach kurzer Durchmischung, Zentrifugation und Abkühlung wurden die Proben sofort aufgetragen oder bei -20 °C bis zu Verwendung gelagert.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Bei der Vorbereitung der Proben (siehe 2.3.1.3) werden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen. Dafür wurden den Proben Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate* SDS; Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen) und β -Mercaptoethanol (Aufspalten der Disulfidbrücken durch Reduktion) zugegeben und aufgeköcht. Der verwendete Probenpuffer enthielt außerdem Glycerin zur Erhöhung der Probendichte (ermöglicht Absinken der Proben in den Geltaschen) und Bromphenolblau zum Anfärben der Proben. Das SDS im Probenpuffer bindet an die Proteine (1,4 g SDS pro 1 g Protein) und überdeckt deren Eigenladung. Die entstehenden SDS-Protein-Komplexe haben eine konstante negative Ladung weshalb diese bei Anlegen einer Spannung von der Kathode (negativer Pol) zur Anode (positiver Pol) wandern. Dies erlaubt eine Auftrennung nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, denn die längeren Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine (s. u.) und verbleiben damit weiter oben im Gel. Dabei ist die zurückgelegte Wegstrecke bzw. elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes.

Das zur SDS-PAGE verwendete Polyacrylamidgel besteht aus einem pH-neutralem Sammelgel und einem basischen Trenngel. Durch diesen pH-Gradienten sammeln sich die Proben an der Grenze zwischen den beiden Gelen [Laemmli, 1970]. Die Gele werden durch Polymerisation von linearen Polyacrylamidketten und dem zur Quervernetzung dienenden Bisacrylamid hergestellt. Der prozentuale Anteil an Acrylamid im Gel bestimmt die Anzahl der Quervernetzungen und somit die Größe der entstehenden Poren - je höher der Anteil, desto kleiner die Poren. Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) fungieren als Starter bzw. Katalysator der Polymerisierung und sollten erst kurz vor dem Gießen des Gels zugegeben werden.

Als erstes wurden zwei zusammengehörige staub- und fettfreie Glasscheiben (getrennt durch 1,0 oder 1,5 mm-dicke Abstandhalter) auslaufdicht in einem Gelgießstand von Bio-Rad fixiert. Die 10%igen Trenn- und Sammelgele wurden bis auf APS und TEMED bereits vorbereitet (siehe Tabelle 5, Seite 34). Zunächst wurde das Gesamtgelvolumen zu Dreivierteln mit dem fertigen Trenngel gefüllt. Darauf wurden 300 μ l Isopropanol gegeben, um die Ausbildung einer glatten Abschlusskante zu gewährleisten. Nach ~30 min wurde das Isopropanol mittels Filterpapier entfernt und das Spaltvolumen mit dem fertigen Sammelgel aufgefüllt. Der Kamm für die Geltaschen wurde anschließend sofort in das Sammelgel zwischen die Glasscheiben gesteckt. Nach ihrer Auspolymerisierung (mindestens 30 min)

wurden die Gele entweder in feuchte Tücher geschlagen und in einer Plastiktüte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (maximal 1–2 Wochen) oder sofort für eine Gelelektrophorese genutzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamidgels

<u>Trenngel:</u>	Geldicke in mm		Molarität / Gehalt im Gel
	1	1,5	
dest. H ₂ O	2,025 ml	3,038 ml	
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	1,25 ml	1,875 ml	375 mM
SDS (w/v) 10 %	50 µl	75 µl	0,10%
Acrylamid 30 %	1,65 ml	2,475 ml	10%
TEMED	2,5 µl	3,75 µl	0,05%
APS (w/v) 10 %	25 µl	37,5 µl	0,05%
<u>Sammelgel:</u>			
dest. H ₂ O	1,525 ml	2,288 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	0,625 ml	0,938 ml	125 mM
SDS (w/v) 10 %	25 µl	37,5 µl	0,10%
Acrylamid 30 %	0,335 ml	0,503 ml	4%
TEMED	2,5 µl	3,75 µl	0,10%
APS (w/v) 10 %	12,5 µl	18,75 µl	0,05%

Jeweils zwei Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kämme vorsichtig entfernt und die Kammer mit Laufpuffer (Zusammensetzung siehe 3., Tabelle 7; Seite 47) gefüllt. Die darin enthaltenen Elektrolyte ermöglichen den negativ geladenen Proteinen in den vorbereiteten Proben (s. o.) ein Wandern im parallel zum Gel angelegten elektrischen Feld. Nach Beladung des Gels mit einem als Molekulargewichtsmarker dienenden angefärbten Proteinstandard (Bio-Rad) in der ersten Tasche und den Proben (maximal 9 pro Gel) in den Taschen 2 bis 10, wurde eine Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt. Nachdem die durch das Bromphenolblau gefärbte Lauffront der Proben unten aus dem Polyacrylamidgel gelaufen war, wurde die Gelelektrophorese gestoppt und die aufgetrennten Proteine durch einen nachfolgenden *Western Blot* auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

2.3.3 *Western Blot*

Beim *Western Blot*, modifiziert nach Towbin [Towbin *et al.*, 1979], wird ein senkrecht zum SDS-Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine in Richtung der Anode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden können. An dieser bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkung haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bleibt dabei erhalten. Der Aufbau eines hier verwendeten *Western Blots* ist in Abbildung 11 (Seite 35) schematisch dargestellt. Die Sandwich-Halterung, Schwämme und das Filterpapier dienen dabei der Fixierung von Gel und Membran zueinander und innerhalb des elektrischen Feldes.

Nach dem Zusammenbau wurde die Sandwich-Halterung mit einem Eisakku in den Blot-Tank eingesetzt und dieser mit dem Methanol-Blotpuffer (Zusammensetzung siehe 3, Tabelle 7; Seite 47) vollständig gefüllt. Nach 130 min bei einer Stromstärke von 200 mA pro Gel wurde der Blot gestoppt und auseinandergebaut. Als Nachweis für einen erfolgreichen Proteintransfer diente der angefärbte Proteinstandard. Mit einer Ponceau-Rot-Färbung können zusätzlich alle transferierten Proteine und eventuelle Luftblasen sichtbar gemacht werden – dies wurde zur Versuchsabsicherung bei einem Großteil der *Western Blots* durchgeführt. Dafür wurden die Membranen in Ponceau-Rot-Lösung (siehe 3, Tabelle 7; Seite 47) für 30–60 s leicht schüttelnd inkubiert und mit dest. Wasser solange gewaschen bis sich die rötlichen Proteinbanden deutlich vom weißen Membranhintergrund abgesetzt haben. Das Ponceau wurde anschließend durch Waschen mit destilliertem Wasser, TBS-T (*Tris-Buffered Saline* mit 1 % Tween® 20) oder Blockierungspuffer (siehe 3, Tabelle 7; Seite 47) entfernt.

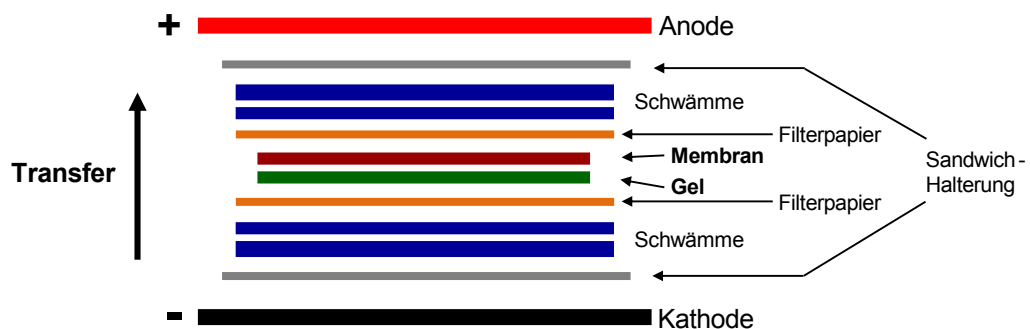


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines *Western Blot*

2.3.4 Immunologischer Proteinnachweis und Auswertung

Bei der Detektion von spezifischen Proteinen im *Western Blot* wird die Antigen-Antikörper-Bindung genutzt. Dabei bindet der Primärantikörper mit seiner Antigen-Bindungs-Region an sein spezifisches Epitop, das gesuchte Protein. Daraufhin kann ein mit Meerrettichperoxidase-konjugierter Wirt-spezifischer Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden, welches einen indirekten Nachweis des gesuchten Proteins mittels Chemilumineszenzdetektion ermöglicht.

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen in je ein 50 ml-Röhrchen überführt und alle anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte auf einem Rollenmischer durchgeführt. Als erstes wurden die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert. Dafür wurde die Membran für 30–60 min mit Blockierungspuffer (5 % Milchpulver in TBS-T) bei ZT inkubiert. Wenn der Primärantikörper in 1 % Milchpulver angesetzt war, wurde die Membran anschließend gewaschen (3 x 5 min mit TBS-T). Dann folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper bei 4 °C über Nacht (Standard) oder bei ZT für 1 h

(bei Actin). Nach weiterem Waschen inkubierte die Membran 1 h bei ZT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper. Danach wurde die Membran gewaschen und das gesuchte Protein konnte detektiert werden. Dafür wurde die Membran innerhalb des ChemiDoc™ XRS+ Systems (Chemidoc; Bio-Rad) platziert und mit 2 ml einer vorbereiteten lichtempfindlichen Chemilumineszenz-Lösung (20 °C; siehe 3, Tabelle 7; Seite 47) benetzt. Die am Sekundärantikörper befindliche Meerrettichperoxidase katalysierte nun die Oxidation des in der Lösung enthaltenen Luminols. Die dabei entstandene Lumineszenz konnte mit dem Chemidoc detektiert werden. Die Expositionszeiten variierten von 2–300 s - je nach Intensität des Signals.

Die aufgenommenen Bilder der Proteinbanden wurden anschließend semiquantitativ mit der Quantity One® 1-D Analysis Software von Bio-Rad ausgewertet. Dabei wurde die Intensität der Pixel bezogen auf das markierte Bandenvolumen abzüglich einer Hintergrundintensität in Prozent (Bezeichnung: % Adjusted Volume) als Parameter für die spätere Auswertung gewählt. Eine Normalisierung der phosphorylierten Proteine erfolgte auf den Wert der jeweiligen unphosphorylierten Form, ansonsten auf den entsprechenden Wert von Actin. Alle errechneten Expressions- bzw. Aktivierungswerte sind Prozentangaben im Bezug zur Vehikelkontrolle.

Eine Übersicht der verwendeten Antikörper (inklusive eingesetzter Verdünnungen und Molekulargewicht des jeweiligen Proteins) befinden sich unter 3. in Tabelle 11 auf Seite 52. Alle primären Antikörper von der Firma Cell Signaling wurden mit 5 % und alle anderen mit 1 % Milchpulver in TBS-T angesetzt. Die Konzentration an Milchpulver in der sekundären Antikörperlösung entsprach immer der des Primärantikörpers.

2.3.5 Wiederverwendung der Membranen

Bei Analyse mehrerer Proteine können die Antikörperkomplexe nach der Immundetektion mit Glycin-Strip-Puffer (pH 2,5; Zusammensetzung siehe 3, Tabelle 7; Seite 47) wieder von der Membran entfernt werden. Dafür wurde nach 5 min Waschen mit TBS-T die Membran 2 x 15 min mit dem Strip-Puffer inkubiert und anschließend gewaschen. Die Membran konnte jetzt wieder geblockt, mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und ein weiteres Protein detektiert werden.

Da es gerade bei der Erstellung von Zeitverläufen in der Aktivierung verschiedener Kinasen nötig gewesen wäre, die Membranen bis zu 8 x wiederzuverwenden, wurden die Membranen nach der Ponceau-Färbung bei ~80 kDa zerschnitten und parallel mit zwei Antikörperlösungen inkubiert. Durchgeführt wurde dies zur Detektion der FAK. Das Molekulargewicht der FAK beträgt 125 kDa und das aller anderen Proteine ≤ 60 kDa. Die Reihenfolge der Inkubationen mit den verschiedenen Primärantikörpern war: phospho-JNK, phospho-Akt/PKB, JNK, Akt/PKB, phospho-ERK, ERK und Actin.

2.4 Quantitative *Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*

Die quantitative Echtzeit - Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-time RT-PCR*) ist eine Vervielfältigungsmethode für mRNA (*messenger ribonucleic acid*; Boten-Ribonucleinsäure). Dabei wird die Nutzung einer reversen Transkriptase zur Umschreibung der mRNA in cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*; komplementäre Desoxyribonukleinsäure) mit einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion kombiniert. Durch Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen (Echtzeit) kann zusätzlich die gewonnene cDNA quantifiziert werden [Hunger-Glaser *et al.*, 2003].

2.4.1 Isolierung der RNA

Zur Analyse der mRNA wurden 20.000 Zellen/cm² im 24-Well-Format ausgesät (entspricht 38.000 ASC/Well) und nach 2-3 Tagen stimuliert. Zum Zeitpunkt der Analyse wurde die RNA mit dem RNeasy® Mini Kit (Quiagen) isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstelleranweisung. Pro 24-Well wurden folgende Schritte bei ZT ausgeführt:

1. Zellyse: Absaugen des Stimulationsmediums und Zugabe von 350 µl RLT-Puffer und Inkubation für 2 min → Zugabe von 350 µl Ethanol (70 %, unvergällt) und gut mit Pipette mischen
2. Binden der RNA an die Säulchenmembran: Bis zu 700 µl der Zelllysate auf ein Säulchen (*spin column*) geben und bei 8000 g für 15 s zentrifugieren → Unterstand werfen und Säulchen in ein neues RNase-freies 2 ml-Tube transferieren
3. Waschen der RNA:
 - I. Zugabe von 700 µl Waschpuffer 1 (RW1) und bei 8.000 g für 15 s zentrifugieren → Unterstand werfen
 - II. Zugabe von 500 µl Waschpuffer 2 (RPE) und bei 8.000 g für 15 s zentrifugieren → Unterstand werfen
 - III. Wiederholung von Waschschrift II → Zentrifugation bei 14.000 g für 1 min
4. Eluierung der RNA:
 - I. Säulchen in ein neues RNase-freies 1,5 ml-Tube überführen und Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Säulchen-Membran → Zentrifugation bei 8000 g für 1 min
 - II. Wiederholung von Eluierungsschritt I → RNA in 60 µl Eluat

Die RNA wurde bei sofortiger Nutzung auf Eis, innerhalb von 24 h bei -20 °C und ansonsten bei -80 °C gelagert. Die Zellen konnten mit RLT-Puffer bedeckt mehrere Monate bei -80 °C gelagert und die RNA zu einem späteren Zeitpunkt aufgereinigt werden.

2.4.2 Real-time RT-PCR

Die Real-Time-RT-PCR beruht auf der Messung der Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Emission mit dem Expressionslevel des Zielgens korreliert. Die Quantifizierung der Ribonukleinsäuren wurde mit TaqMan® *Gene expression assays* (Primer und Sonde) in einem 7500 *Fast Real-Time PCR System* von Applied Biosystems® durchgeführt.

Die TaqMan®-Methode basiert auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Das Reporter-Fluorochrom (Donor) wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und überträgt seine Energie auf den sog. *Quencher* (Akzeptor). Bei einer TaqMan®-Sonde sitzen Reporter und *Quencher* auf demselben Oligonucleotid, wobei der Reporter am 5'-Ende und der *Quencher* am 3'-Ende lokalisiert ist. Als fluoreszierender Reporter dient hier 6-Carboxyfluorescein (FAM), während der nicht fluoreszierende *Quencher* und mit einem sog. *minor groove binder* (erhöht Stabilität und Sequenzspezifität der Sonde; Kutyaev *et al.*, 2000) kombiniert ist. Solange die Sonde intakt ist, wird eine Emission des Fluoreszenzsignals vom *Quencher* verhindert. Wird der Reporter durch die 5'-3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom *Quencher* räumlich getrennt, kann dessen Fluoreszenz freigesetzt und detektiert werden. Je mehr Amplifikate gebildet werden, desto mehr Fluoreszenz wird emittiert.

Zur Quantifizierung wird die Kinetik der PCR-Reaktion genutzt. Wenn das Fluoreszenzsignal exponentiell ansteigt und sich erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt, wird dies als Ct-Wert (*Cycle of threshold*) registriert. Dieser Wert wurde für die weitere Auswertung genutzt. Je höher die Menge der angefertigten Kopien des Zielgens zu Beginn ist, desto früher wird dieser Schwellenwert erreicht und desto kleiner ist der Ct-Wert. Da während jedem PCR-Zyklus die Menge des PCR-Produktes idealerweise verdoppelt wird, entspricht die Expression des Zielgenes $2^{-Ct(\text{Zielgen})}$. Um das Expressionslevel eines bestimmten Gens zu ermitteln, muss es mit der Menge an eingesetzter RNA bzw. einer entsprechenden Konstante in Beziehung gesetzt werden. Deswegen wurden hier die Ct-Werte des nicht regulierten Referenzgens β -Actin von den Ct-Werten des Zielgens abgezogen ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\beta\text{-Actin}}$). Wenn Regulationen im Bezug zu einer Kontrolle bestimmt werden sollten, wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ohne Effizienz-Korrektur angewendet [Livak und Schmittgen, 2001]. Hierbei werden zusätzlich die ΔCt -Werte der untersuchten Stimulanz auf die ΔCt -Werte der Vehikelkontrolle normalisiert.

2.4.2.1 TaqMan® Array Human Osteogenesis

Die TaqMan® Arrays enthalten vordefinierte getrocknete TaqMan® *Gene expression assays* und endogene Kontrollen in einer 96-Well-Platte zur Analyse bestimmter biologischer Prozesse, Signalübertragungswege oder auch Krankheiten. Der TaqMan® *Array Human Osteogenesis* beinhaltet verschiedene Gene assoziiert mit der Differenzierung und Determinierung von Osteoblasten wie BMP1-7, 19 verschiedene Typen von Collagen,

FGF1-3, VGFA-C oder Alkalische Phosphatase (ALPL; siehe 0). Eine komplette Übersicht der Zielgene befindet sich im Anhang in Tabelle 14 (Seite xvii).

Für diesen *Array* wurden 20.000 Zellen/cm² im 6-Well-Format (entspricht 192.000 ASC/Well) ausgesät und nach 3 Tagen mit Vehikel, 3 µM CBD oder 100 nM Dexamethason (osteogen stimuliert, kurz OS) in Medium mit 1 % FKS und 1 mM β-Glycerophosphat und 25 µg/ml Ascorbinsäure stimuliert. Die Platten wurden jeweils nach 0 (vor der Stimulation), 3 und 14 Tagen mit RLT-Puffer bei -80 °C eingefroren. Von drei Spendern, bei denen eine osteogene Differenzierung mittels Anstieg der ALP-Aktivität und Mineralisierung nachgewiesen werden konnte, wurde die RNA schließlich aufgereinigt (siehe 2.4.1, Seite 37; 5 Säulchen pro Well und Eluierung mit jeweils 2 x 20 µl RNase-freiem Wasser) und anschließend die Proben mit den gleichen Bedingungen (je 100 µl pro Bedingung und Spender) vereinigt.

Von diesen 7 „RNA-Pools“ (0 d; 3 d: Vehikel, CBD, OS; 14 d: Vehikel, CBD, OS) wurde der RNA-Gehalt und -Reinheit bestimmt, indem die optischen Dichten (ODs) in einer Doppelbestimmung bei 260 und 280 nm am Photometer gemessen wurden. Eine OD_{260 nm} gleich 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das bedeutet der RNA-Gehalt ergibt sich aus OD_{260 nm} x 40 x Verdünnungsfaktor. Der Gehalt betrug 32,3 ± 8,7 ng/µl (MW ± SD) und die Reinheit (OD_{260 nm}/OD_{280 nm}; reine RNA = 2) 1,91 ± 0,12 (MW ± SD).

Anschließend wurden 6-7 µg RNA pro Bedingung mittels *High Capacity cDNA Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Applied Biosystems®) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung. Aufgrund der großen Anzahl an nötigen Einzelreaktionen (150 x 20 µl) wurde das Reaktionsvolumen von 20 µl auf das vom Hersteller angegebene Maximum von 100 µl hochgesetzt (50 µl Mastermix plus 50 µl RNA), was den in Tabelle 6 zusammengefassten 2 x RT-Mastermix pro Reaktion bedingte, welcher auf Eis zusammenpipettiert und gelagert wurde. Die reverse Transkription wurde schließlich unter folgenden Thermozyklereinstellungen durchgeführt: 1.) 10 min bei 25 °C, 2.) 120 min bei 37 °C, 3.) 5 min bei 85 °C und anschließend sofort auf 4 °C abkühlen. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 6: Zusammensetzung des 2 x RT Master Mix pro 100 µl Reaktion

	in µl
10 x RT-Puffer	10
25 x dNTP Mix	4
10 x Random Primers	10
MultiScribe RT	5
RNase Inhibitor	5
Wasser	16
Summe	50

Für den *Array* wurden die cDNA-Proben auf Eis aufgetaut und pro Platte 270 µl cDNA (entspricht 4,37 ± 1,18 µg eingesetzte RNA pro Platte) mit 270 µl RNase-freiem Wasser und 540 µl Mastermix (TaqMan® Fast Universal PCR Mix) zusammenpipettiert und vermischt.

Nach einer Zentrifugation der Arrayplatte für 1 min bei 1000 g wurden pro Well 10 µl des vorbereiteten Ansatzes mit einer Multipipette hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte mit *Optical Adhesive* Film abgedeckt und nochmal bei 1000 g für 1 min zentrifugiert. Die quantitative und komparative PCR konnte nun mit folgenden Einstellungen im Fast-Modus gestartet werden: erst 20 s bei 95 °C (*Hold*) und dann 40 Zyklen mit je 3 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C.

Zur Auswertung der 7 Bedingungen bzw. 7 Arrayplatten wurde der *threshold* (ΔR_n) für alle PCRs auf 0,1 festgelegt, da sich dieser Wert im exponentiellen Bereich der Kurven bei allen Bedingungen befand (siehe repräsentativen Amplifizierungsgraph in Abbildung 12, Seite 40). Das bedeutet, dass der PCR-Zyklus als Ct-Wert zählte, bei dem die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes, bezogen auf einen passiven Referenzfarbstoff (R_n) und abzüglich der Hintergrundfluoreszenz, einen Wert von 0,1 erreichte. Die Hintergrundfluoreszenz oder *baseline* (siehe Abbildung 12) entspricht der Fluoreszenz der ersten PCR-Zyklen, in denen es kaum zu einer Änderung der Signalstärke kommt.

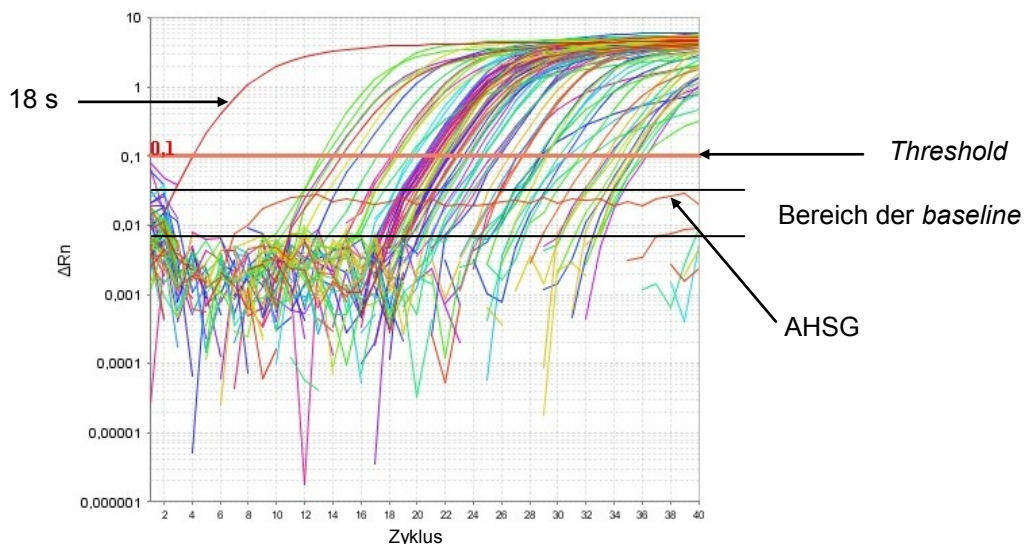


Abbildung 12: Amplifizierungsgraph der 0 d-Osteo-Array-Platte.

Verlauf der normierten Reporter-Fluoreszenz (ΔR_n ; gemessener Wert abzüglich *baseline*) über alle 40 PCR-Zyklen. Der *Threshold* wurde auf 0,1 festgelegt und die *baseline* (Hintergrundfluoreszenz) wurde für jedes der 96 Zielgene von der Software 7500 v2.0 (Applied Biosystems) individuell festgelegt. Die Zyklen zur Bestimmung der *baseline* variierten von 1.-2. Zyklus (18 s; eukaryotische 18 s ribosomale RNA) bis 3.-39. Zyklus (AHSG, *alpha-2-HS-glycoprotein*), wobei bei letzterem kein Ct-Wert (*threshold cycle*) determiniert werden konnte. Der Graph wurde mit der Software 7500 v2.0 von Applied Biosystems erstellt und modifiziert.

Um das Risiko einer falschen Bewertung der Expressionen von Zielgenen aufgrund von Varianzen innerhalb der Expression eines einzelnen endogenen Kontrollgens zu minimieren, wird die Verwendung des geometrische Mittelwertes (MW) von mindestens zwei bzw. drei endogenen Kontrollen empfohlen. Der geometrische MW ist im Gegensatz zum arithmetischen MW robuster gegenüber Ausreißern und Expressionsunterschieden zwischen einzelnen Genen [Thellin *et al.*, 1999; Vandesompele *et al.*, 2002]. Gerade die β -Glucuronidase (GUSB) hat sich in ASC, auch unter Hypoxiebedingungen, als sehr stabil

erwiesen, währenddessen die 18 S ribosomale RNA mindestens 2fach anstieg [Fink *et al.*, 2008]. Für die Normalisierung der Zielgene wurde deshalb der geometrische Mittelwert der Ct-Werte von drei der vier vorhandenen endogenen Kontrollen gebildet: von GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1*) und GUSB.

2.5 *In vitro* Differenzierungsanalysen

Für die quantitativen Differenzierungsanalysen wurden 20.000 Zellen/cm² im 96-Well-Format ausgesät (entspricht 6.800 ASC/Well). Die Stimulation erfolgte über 4-5 Wochen, wobei immer nach 14 und 28 bzw. 35 d, optional auch nach 7 und 21 d, die Zellzahl (Kristallviolett-Färbung), die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) und die metabolische Zellaktivität (MTS-Test) bestimmt wurden. Der Kalziumgehalt der extrazellulären Matrix (mittels Kresolphthalein-Komplexierung) wurde ausschließlich zum Endpunkt des Versuches nach 28 oder 35 d bestimmt.

Die qualitativen Analysen erfolgten wegen der besseren Mikroskopierbarkeit im 24-Well-Format (entspricht 38.000 ASC/Well). Der Zeitpunkt zur Dokumentation des Kalziumgehaltes der extrazellulären Matrix (Alizarinrot-Färbung) war nach 28 bzw. 35 d.

2.5.1 Quantifizierung der Zellzahl

Der violette Triphenylmethanfarbstoff Kristallviolett (Hexamethyl-p-rosanilin-chlorid) färbt als basischer Farbstoff die DNA in Zellkernen an und kann somit zur Zellzahlbestimmung in einschichtigen Zellkulturen genutzt werden. Das DNA-gebundene Kristallviolett kann anschließend wieder eluiert und die optische Dichte des Eluats gemessen werden, welche direkt mit der Zellzahl korreliert (Sensitivität ~500 Zellen) [Gillies *et al.*, 1986]. Zur Messung wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. 2 x mit PBS waschen
2. Zugabe von 80 µl Isopropanol und Inkubation für 10 min
3. 3 x mit PBS/0,05 % Tween® 20 waschen
4. Zugabe von 50 µl Kristallviolett-Lösung (1 mg/ml Aqua dest.) und Inkubation für mindestens 20 min
5. 5 x mit Millipore-Wasser waschen
6. Zugabe von 100 µl Essigsäure (33 %) und leicht schüttelnd für 12 min inkubieren
7. 70 µl des Überstandes in eine Readerplatte pipettieren und optische Dichte bei 620 nm am Elisa-Reader messen

Eine Quantifizierung erfolgte abzüglich eines Blankwertes (Mitführung ab 4., ohne Zellen) und bezogen auf den Mittelwert der Vehikelkontrolle in Prozent. Außerdem stellte der

jeweilige Mittelwert jeder Kondition die Bezugsgröße für eine Zellzahlnormalisierung für die anderen quantitativen Assays dar.

2.5.2 Quantifizierung der metabolischen Zellaktivität

Eine Übertragung von Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH via Kopplungsreagenz (hier: Phenazin Ethosulfat) an das Tetrazoliumsalz MTS führt zu dessen Reduktion in seine Formazanform [Berridge *et al.*, 2005]. Dabei kommt es zu einer Farbänderung von Gelb zu Rot-Braun. Da NADH vor allem im Katabolismus bei der Glykolyse und im Zitratzyklus entsteht [Pollak *et al.*, 2007], ist ein Anstieg des Formazangehaltes ein indirekter Nachweis für metabolische Zellaktivität. Verwendet wurde hier eine MTS-Lösung von Promega (CellTiter 96® *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*). Das Durchführungsprotokoll lautete wie folgt:

1. Vorbereitung einer 37 °C warmen MTS-Medium-Lösung: pro Well je 20 µl MTS-Lösung auf 100 µl DMEM mit 10 % FKS
2. Stimulationsmedium abnehmen (Ausschlagen der Platte) und je 120 µl der MTS-Medium-Lösung hinzugeben
3. Inkubation der Zellen für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank
4. Überführung von 100 µl des Überstandes in eine Readerplatte und Messung der Extinktion bei 490 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

Eine Quantifizierung erfolgte abzüglich eines Blankwertes (MTS-Medium-Lösung ohne Zellen), welcher ab 2. mitgeführt wurde.

2.5.3 Quantifizierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (ALP) katalysiert die Hydrolyse seines synthetischen Substrates *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu dem gelben *para*-Nitrophenol, welches sein Absorptionsmaximum bei 405 nm hat [Cleland und Hengge, 2006; Montalibet *et al.*, 2005]. Durch Messung der optischen Dichte nach einer festgelegten Zeitdauer kann somit indirekt die Aktivität der ALP ermittelt werden. Die Zusammensetzung der Puffer befindet sich in Kapitel 3 in Tabelle 7 (Seite 47) und die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. 2 x mit TBS waschen
2. Zugabe von 50 µl Lysepuffer für 10 min bei ZT
3. Zugabe von 200 µl Messpuffer für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank
4. Zugabe von 85 µl NaOH (2 M) zum Abstoppen der Reaktion
5. Überführung von 200 µl in eine Readerplatte und Messen der Extinktion bei 405 nm am Microplate-Reader

Eine Quantifizierung erfolgte abzüglich eines Blankwertes (Mitführung ab 2.; ohne Zellen).

2.5.4 Bestimmung des Kalziumgehaltes der extrazellulären Matrix

2.5.4.1 Alizarin-Rot-Färbung für Mikroskopie

Das Anthrachinonderivat Alizarinrot (1,2-Dihydroxyanthrachinon) bildet mit Kalziumionen doppelbrechende Chelatkomplexe, wodurch kalziumreiche Ablagerungen in den Zellen sichtbar gemacht werden können [Gregory *et al.*, 2004]. Das Färbeprotokoll lautete wie folgt (Durchführung bei ZT):

1. 2 x Waschen mit PBS
2. Fixierung der Zellen mit 200 µl Paraformaldehyd (4 %) für 7 min
3. 3 x Waschen mit PBS
4. Anfärben der Kalziumionen mit 200 µl 40 mM Alizarinrot* für 10 min
*pH 4,2 (4,1–4,3) - Einstellen mit Ammoniumhydroxid (25 %)
5. 3 x Waschen mit PBS → 1 x Waschen mit dest. Wasser → Mikroskopieren

2.5.4.2 Kresolphthalein-Komplexierung zur Quantifizierung des Kalziumgehaltes

Ortho-Cresolphthalein Complexone ist ein Indikator für eine chelatometrische Bestimmung von Metallionen (Magnesium, Kalzium, Strontium, Barium) in wässrigen Lösungen. Kresolphthalein bildet mit diesen Kationen violette Komplexe. Da nur der Gehalt an Kalziumionen bestimmt werden sollte, wurden die Magnesiumionen durch Zugabe der Chelatierungssubstanz 8-Hydroxychinolin gebunden [Sarkar und Chauhan, 1967]. Da Strontium und Barium *in vivo* und *in vitro* nur in Spuren enthalten sind, wurden sie hier vernachlässigt.

Anfänglich diente *o-Cresolphthalein Complexone* dem Nachweis von Kalzium in Serum und Urin [Kessler und Wolfman, 1964]. Später erfolgte die Anpassung zur Bestimmung des Kalziumgehaltes in der extrazellulären Matrix [Gitelman, 1967; Wada *et al.*, 1999]. Dabei werden die Kalziumionen erst mittels einer sauren Lösung (inkl. Magnesiumchelatierung; siehe Kresolphthalein-Puffer) herausgelöst und anschließend unter alkalischen Bedingungen (siehe 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, AMP-Puffer) komplexiert. Der Kalziumgehalt wurde bei ZT nach dem folgenden Protokoll bestimmt:

1. 2 x mit PBS waschen
2. Fixierung der Zellen mit je 80 µl Paraformaldehyd (4 %) für 7 min
3. 2 x mit dest. Wasser waschen
4. Zugabe von 100 µl Kresolphthalein-Puffer (siehe Kapitel 3, in Tabelle 7, Seite 47) für 5 min
5. Zugabe von 100 µl AMP-Puffer (siehe Kapitel 3, in Tabelle 7, Seite 47) für 15 min
6. Überführung von 100 µl in eine Readerplatte und Messung der Extinktion bei 580 nm am Microplate-Reader

Eine Quantifizierung erfolgte abzüglich eines Blankwertes (Mitführung ab 4.; ohne Zellen).

2.6 Datenanalyse und Statistik

2.6.1 Normalisierung der Differenzierungsdaten

Um eine Verfälschung der Differenzierungsanalysen durch Unterschiede in Viabilität oder Proliferation der ASC zu verhindern, wurden die Differenzierungsdaten auf die Zellzahl normalisiert. Diese wurde als relativer Wert in der Kristallviolett-Färbung bestimmt (siehe 2.5.1, Seite 41). Die einzelnen optischen Dichten (ODs) der quantitativen Färbungen zur Ermittlung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), der metabolischen Zellaktivität (MTS) und der Mineralisierung (Kresolphthalein-Komplexierung) wurden zur Normalisierung auf den entsprechenden arithmetischen Mittelwert der ODs von Kristallviolett (KV) bezogen.

Geringe Konzentrationen an Kalziumionen in der extrazellulären Matrix können in einigen Fällen unter der Nachweisgrenze der Kresolphthalein-Komplexierung liegen. Es gab vereinzelte Spender (sog. *Non-Responder*), bei denen die gemessenen Extinktionen nur leicht über oder sogar unter denen des mitgeführten Blank-Wertes lagen. Um den CBD-Effekt auf die osteogene Differenzierung nicht durch solche negativen Werte zu verzerren, wurden nur Experimente in die Auswertung einbezogen, bei denen alle ODs des Versuches über X_{\min} lagen. X_{\min} entspricht dabei dem arithmetischen Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung der Blank-Werte.

Zur Analyse der stärker schwankenden Differenzierungseffekte wurden die Daten von möglichst vielen Stammzellspendern zusammengefasst. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde jeder Spender mit nur einem einzelnen Wert pro Ansatz in die statistische Auswertung einbezogen – mit dem Median der technischen Replikate. Die Vorversuche zur geeigneten FKS- und CBD-Konzentration wurden mit maximal zwei Spendern durchgeführt. Hier erfolgte die Einbeziehung aller technischen Replikate, um eine statistische Auswertung und Darstellung der Daten zu ermöglichen.

2.6.2 Statistische Auswertung

Nach der Transformation aller Rohdaten in Prozent der Vehikelkontrolle (optische Dichten der Quantifizierungen von ALP, MTS und Kresolphthalein wurden vorher auf den Mittelwert der entsprechenden ODs aus dem Kristallviolett-Assay normalisiert), wurden die Daten mit dem D'Agostino-Pearson Normalitäts-Test („omnibus K2-Test“) auf Normalverteilung geprüft.

Bei den nahezu vollständig normalverteilten Daten der Migrationsanalysen wurden Gauß-Verteilung und gleiche Varianzen in den Gruppen für alle Migrationsdaten verallgemeinert. Es wurden bei Gruppenvergleichen immer dieselben Tests angewendet: bei Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen ein zweiseitiger t-Test für ungepaarte Stichproben und bei Vergleich von drei oder mehr Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*; ANOVA) mit anschließendem Signifikanztest. Als Post-hoc-Test diente bei Vergleich mehrerer Gruppen gegen eine Kontrollgruppe der Dunnett-Test und bei unterschiedlichen Vergleichen (z. B. Stimulanz gegen Vehikel und

Stimulanz plus Inhibitor gegen Stimulanz) der Bonferroni's *Multiple Comparisons Test* mit ausgewählten Vergleichen zwischen den Gruppen.

Die Differenzierungsdaten wiesen überwiegend keine Normalverteilung auf (insbesondere ALP- und Kresolphthalein-Daten). Deshalb wurden für alle Differenzierungsparameter (inkl. Zellzahl und metabolische Zellaktivität) nichtparametrische Tests für die Auswertung verwendet: bei Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test und bei Vergleich von mindestens drei Gruppen ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's *Multiple Comparisons Test* (mit ausgewählten Vergleichen zwischen den Gruppen) angewendet. Pro Spender wurde jeweils der Median der technischen Replikate zur Auswertung und Darstellung herangezogen. Wenn nur der Vergleich mit einem einzelnen Wert (wie 100 %) untersucht wurde, lagen gepaarte Stichproben vor. Deshalb diente hier der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test als statistischer Signifikanztest.

Die Normalisierung und Transformierung der Rohdaten wurde mit Microsoft Excel und alle folgenden statistischen Analysen mit GraphPad Prism® 5.04 durchgeführt.

2.6.3 Darstellung der Daten

Die nicht-normalverteilten Differenzierungsdaten (siehe 2.6.2, Seite 44) wurden nach ihrem Rang geordnet im Boxplot als Median \pm 10 und 90 % Whisker dargestellt (siehe Abbildung 13). Der Median ist der Zentralwert und entspricht dem mittleren Rang aller Werte (ungerade Ranganzahl) bzw. dem arithmetischen Mittelwert der zwei mittleren Ränge (gerade Ranganzahl).

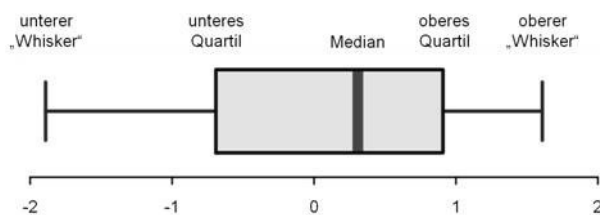


Abbildung 13: Aufbau eines Box-Whisker-Plots.

Die Box umfasst 50 % aller Werte und wird von dem oberen und unteren Quartil begrenzt (75 % bzw. 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Wert). Die Whisker können z. B. den maximalen Wertebereich markieren oder, wie in dieser Arbeit, den Datenbereich der 80 % aller Werte enthält.

Aufgrund der teilweise erheblichen interindividuellen Unterschiede in der Grundaktivität der Alkalischen Phosphatase und dem ECM-Gehalt an Kalziumionen wurden zwei Darstellungsvarianten gewählt:

1. auf die Zellzahl (KV) normalisierte ODs, welche auf den frühesten Zeitpunkt oder die geringste Konzentration bezogen wurden (berücksichtigt Interdonorvarianz und Entwicklung des Parameters über die Zeit);
2. die Gruppenwerte als Prozent des Vehikels zum jeweiligen Zeitpunkt (jeweilige prozentuale Änderung unabhängig von Interdonorvarianz und Entwicklung des Parameters über die Zeit). Wenn nur der Median der Replikate einbezogen wurde, entspricht die Vehikelkontrolle dem Wert 100.

Die normalverteilten Migrationsdaten (siehe 2.6.2) wurden in einem Linien- oder Säulendiagramm, als arithmetische Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*; Standardfehler) abgebildet.

2.6.3.1 Darstellung der Inhibierung der CBD-induzierten Proteinexpression

Um die Wirkung eingesetzter Inhibitoren, Antagonisten oder Agonisten auf die CBD-induzierten Proteinexpressionen besser visualisieren zu können, wurde sie zusätzlich als Prozent CBD-Aktivierung dargestellt. Der MW der CBD-Gruppe wurde dabei auf 0 % gesetzt, damit sofort Richtung und Stärke des jeweiligen Effektes zu erkennen sind. Dafür wurde der MW der Verhältnisse der Proteinexpression der phospho- zur nicht-phospho-Form der Vehikelkontrolle ($MW_{VK_{pp/p}}$) von allen anderen Werten (pp/p von CBD und CBD+X) abgezogen und anschließend diese Verhältnisse auf den MW der CBD-behandelten Zellen bezogen, prozentual berechnet und je 100 Prozentpunkte abgezogen.

3 Material

Der praktische Teil dieser Arbeit entstand in einer Kooperation innerhalb der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock: zwischen dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie (I) und dem Arbeitsbereich Zellbiologie (Stammzelldifferenzierung, II). Dabei wurden alle Zellkulturarbeiten, Stimulationen, mikroskopische Untersuchungen und Differenzierungsanalysen im Arbeitsbereich Zellbiologie durchgeführt und alle weiteren Arbeiten (RNA-Isolation, RT-PCR, Zelllyse, Membranaufreinigung, Gelelektrophorese, Western-Blot-Analysen, *Boyden Chamber Assay*) am Institut für Toxikologie und Pharmakologie. Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen (Tabelle 7), Materialien (Tabelle 8), Substanzen und Chemikalien (Tabelle 9), Geräte und Software (Tabelle 10) und Antikörper inkl. Verdünnungen (Tabelle 11) aufgelistet. Abschließend sind die Hersteller mit genauem Firmennamen und -sitz in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen

	Puffer / Lösung	Substanz	Menge	Molarität / Gehalt
Zelllyse / Gelelektrophorese / Western Blot:	<u>0,5 M Tris pH 6,8</u>	Tris Base Aqua dest.	60,6 g ad 1000 ml	0,5 M
	<u>1,5 M Tris pH 8,8</u>	Tris Base Aqua dest.	181,71 g ad 1000 ml	1,5 M
	<u>Blockierungspuffer (5%)</u>	TBST-T Milchpulver	200 ml 10 g	5 %
	<u>Blotpuffer</u>	Transfer-Puffer (10x) Methanol Aqua dest.	100 ml 200 ml ad 1000 ml	20 %
	<u>Chemilumineszenz-Lösung</u>	Lösung 1 plus 2	1:1	
	Lösung 1:	Luminol 250 mM (in DMSO)	0,5 ml	2,5 mM
		p-Cumarsäure 90 mM (in DMSO)	0,222 ml	400 µM
		Tris-HCl pH 8,5	5 ml	100 mM
		Aqua dest.	ad 50 ml	
	Lösung 2:	H ₂ O ₂ 30%	330 µl	0,2 %
		Tris-HCl pH 8,5	5 ml	100 mM
		Aqua dest.	ad 50 ml	
	<u>Glycin-Strip-Puffer pH 2,5 (5x)</u>	Glycin NaCl Aqua dest.	75,07 g 146,1 g ad 1000 ml	1 M 2,5 M
	<u>Kralewski-Puffer pH 7,4</u>	HEPES NaCl EDTA Triton® X-100 Glycerin Aqua dest.	5,89 g 4,38 g 0,146 g 5 ml 50 ml ad 500 ml	50 mM 150 mM 1 mM 1 % 10 %

	Puffer / Lösung	Substanz	Menge	Molarität / Gehalt
Fortsetzung: Zelllyse / Gelelektrophorese / Western Blot:	<u>Lämmli- bzw. Proben-Puffer (5x)</u>	0,625 M Tris-HCl pH 6,8	2 ml	20 %
		SDS	1 g	10 %
		Glycerin	5 ml	50 %
		β-Mercaptoethanol	0,5 ml	5 %
		Bromphenolblau (1 % in EtOH)	0,5 ml	5 %
		Aqua dest.	ad 10 ml	
	<u>Laufpuffer (10x)</u>	Tris Base	30,28 g	125 mM
		Glycin	144,13 g	960 mM
		SDS	10 g	0,5 %
		Aqua dest.	ad 1000 ml	
	<u>Lysepuffer (Zelllysate)</u>	Kralewski-Puffer	1 ml	
		Aprotinin (1,9 mg/ml)	5,2 µl	9,9 µg/ml
		Leupeptin (0,5 mg/ml)	2 µl	1 µg/ml
		Orthovanadat (100 mM)	5 µl	0,5 mM
		PMSF (100 mM)	10 µl	1 mM
	<u>Ponceaurot-Lösung</u>	Ponceaurot S	0,5 g	0,5 %
		Essigsäure	1 ml	1 %
		Aqua dest.	ad 100 ml	
	<u>TBS pH 7,5 (10x)</u>	Tris Base	121,14 g	1 M
		NaCl	87,65 g	1,5 M
		Aqua dest.	ad 1000 ml	
in vitro Differenzierungs- analysen:	<u>TBS-T</u>	TBS (pH 7,5)	1000 ml	
		Tween® 20	1 ml	
	<u>Transfer-Puffer (10x)</u>	Tris Base	30,3 g	250 mM
		Glycin	142,6 g	1,9 M
		SDS	5 g	0,5 %
		Aqua dest.	ad 1000 ml	
	<u>AMP-Puffer pH 10,7</u>	AMP	3,8 ml	1,6 M
		Aqua dest.	ad 25 ml	
	<u>Kresolphthalein-Puffer</u>	o-Cresolphthalein	2,5 mg	0.1 mg/ml
		8-Hydroxyquinolin	25 mg	1 mg/ml
		HCl (37 %)	1,5 ml	6 %
		Aqua dest.	ad 25 ml	
	<u>Lysepuffer (ALP)</u>	Tween® 20	10 ml	1 %
		Aqua dest.	ad 1000 ml	
		immer frisch dazugeben: PMSF (10 mM, pH 10)	10 ml	100 µM
	<u>Messpuffer (ALP)</u>	pNPP	0,185 g	10 mM
		AMPED (1 M)	5 ml	100 mM
		MgCl ₂ (50 mM)	5 ml	5 mM
		Aqua dest.	ad 50 ml	
	<u>TBS pH 7,4</u>	Tris Base	6,1 g	50 mM
		KCl	0,2 g	2,7 mM
		NaCl	8 g	137 mM
		Aqua dest.	ad 1000 ml	

Tabelle 8: Verwendete Materialien

	Artikelbezeichnung	Hersteller (Abk.)	Katalog-/ Bestell-Nr.
RNA / PCR	RNAeasy [®] Mini Kit (250)	Quiagen	74106
	2-Pack TaqMan [®] Fast Universal PCR Mix (2x)		4366072
	High Capacity cDNA Transcription Kit (with RNase Inhibitor)		4374966
	MicroAmp [®] 96well Reaction Plate	Life (Applied Biosystems [®])	4346907
	MicroAmp [®] Optical Adhesive Film		4311971
	TaqMan [®] Array Human Osteogenesis, Fast 96-Well Plate		4418741
	UVette [®]	Eppendorf	0030 106.300
Migr.	BD BioCoat [™] Control Inserts 24-well 8,0 µm (2 Stück)	BD	354578
Lyse / Gelelekt. / Western Blot	BCA Protein Assay Kit (Pierce [®])	Thermo	23225
	Microcon [®] Ultracel-10 Membrane, 10 kDa	Millipore	MRCPR010
	Microtest Platte (96er)	Sarstedt	82.1581
	Nitrocellulosemembran 0,2 µm	Roth	4685.1
	Proteinstandard Prestained 500 µl	Bio-Rad	161-0318
	ProteoExtract [®] Native Membrane Protein Extraction Kit	Merck	444810
	Rotilabo [®] -Blottingpapiere (0,35 mm)	Roth	CL67.1
	Rotilabo [®] -Abdeckfolien für Mikrottestplatten	Roth	EN76.1
Verbrauchsmaterial I (Lyse, Western Blot, Migration, WST-1-Test)	15 ml-Röhrchen, steril	Sarstedt	62.554.502
	50 ml-Röhrchen, steril	Sarstedt	62.547.254
	Combitips 0,5+2,5+5+10+25 ml	Eppendorf	0030 069.xxx
	Pipettenspitzen TipOne 0,1–10 µl (XL graduated tip)	Star Lab	S1110-3000
	Pipettenspitzen gelb 10–200 µl	Sarstedt	70.760.002
	Pipettenspitzen 100–1000 µl	PeqLab	81-10020
	Pipettenspitzen 500–2500 µl	Eppendorf	0030 000.951
	Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt	72.699
	Reaktionsgefäße 1,5 ml; Safe Seal	Sarstedt	72.706
	Safe Lock Tubes 0,5 ml amber (braun)	Eppendorf	0030 121.155
	Safe Lock Tubes 2 ml amber (braun)	Eppendorf	0030 120.248
	Seropipetten 5 ml	Greiner	606180
	Seropipetten 10 ml	Greiner	607180
	Seropipetten 25 ml	Greiner	760180
ASC: Isol./ CD34-Aufr.	BD Falcon [™] Cell Strainer (100 µm; Nylonsieb, steril)	BD	352360
	BD Falcon [™] Cell Strainer (40 µm; Nylonsieb, steril)	BD	352340
	Dynabeads [®] CD34 Positive Isolation Kit	Life (Invitrogen [™])	113-01D
	DynaMag [™] -15 Magnet (Magnetpartikelkonzentrierer)	Life	123-01D
Verbrauchsmaterial II (Zellkultur - ASC, Differenzierungsanalysen, Mikroskopie)	µ-slides (8 well) ibiTreat, steril	ibidi	80826
	12 ml-Röhrchen, steril	Greiner	164161
	15 ml-Röhrchen, steril	Greiner	188271
	50 ml-Röhrchen, steril	Greiner	227261
	Cryo.s [™] Einfrierrohrchen 2 ml	Greiner	121263
	Einfriercontainer Nalgene [®] Mr. Frosty	Sigma	C1562
	Mikroplatte (96er; zur Bestimmung optischer Dichten)	Greiner	655101
	Multiwellplatte (24er)	Greiner	662160
	Multiwellplatte (6er)	Greiner	657160
	Multiwellplatte (96er)	Greiner	655180
	Neubauer Zählkammer CE	Roth	T734.1
	Pasteurpipetten (230 mm, Glas)	Fisher	10786941
	Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Greiner	765290
	Pipettenspitzen gelb 10-200 µl	Sarstedt	70.760.002
	Pipettenspitzen 100-1000 µl	Greiner	686290
	Reaktionsgefäße (Standard / Safe Lock)	Eppendorf	0030 120.xxx
	Mehrkanal-Pipettenreservoir Trifill (50 ml, 8x 5 ml, 12x 5 ml)	Roth	AA87.1
	Rotilabo [®] - Flüssigkeitsreservoirs (für Färbungen)	Roth	E830.2
	Seropipette (5 +10+25ml)	Greiner	s.o.
	Zellkulturflasche (25 cm ²)	Greiner	690175
	Zellkulturflasche (75 cm ²)	Greiner	658175

Tabelle 9: Verwendete Stimulanzien und Chemikalien

	Artikelbezeichnung	Hersteller (Abk.)	Katalog-/ Bestell-Nr.
Stimulanzien / Agonisten / Antagonisten / Inhibitoren	(-)-CBD	R&D (TOCRIS)	1570
	(-)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	Lipomed	THC-135-10LE
	AM-251	Biomol (Cayman)	CAY71670
	AM-630	Biomol (Cayman)	CAY10006974
	Capsazepin	Sigma	C191
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem	A3672
	JWH-133	R&D (TOCRIS)	1343
	LY294002	Sigma	L9908
	O-1602	R&D (TOCRIS)	2797
	O-1918	Biomol (Cayman)	CAY10004914
	PD98059	R&D (TOCRIS)	1213
	PP2	R&D (TOCRIS)	1407
	SB203580	Biomol (Enzo)	BML-EI286
	SP600125	Biomol (Enzo)	BML-EI305
Gelelektrophorese / Western Blot / WST-1-Test	Aprotinin	Sigma	A4529
	APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma	A3678
	Aqua ad injectabilia	ZAP	28707011
	Bromphenolblau (Natriumsalz, für Elektrophorese)	Sigma	B5525
	DPBS (500ml)	PAN	P04-36500
	EDTA	AppliChem	A1103
	Essigsäure 100% p.a.	Roth	3738.4
	Ethanol 70% vergällt; Ethanol, absolut	ZAP	-
	Glycerin	AppliChem	A1123
	Glycin	AppliChem	A1067
	H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid) 30%	AppliChem	A0626
	HEPES	Ferak	00796
	Isopropanol (2-Propanol)	ZAP	-
	Leupeptin	Biomol	12136.25
	Luminol	Sigma	A8511
	Methanol	ZAP	340 10 640
	Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad	170-6404
	NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem	A4661
	NaOH (Natriumhydroxid)	AppliChem	A1551
	Orthovanadat	Sigma	S6508
	p-Cumarsäure	Sigma	C9008
	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma	P7626
	Ponceaurot S	AppliChem	A1405
	Rotiphere® Gel 30 (37,1:5)	Roth	3029.1
	SDS (Dodecylsulfat-Natriumsalz), ultrapure	AppliChem	A1112
	β-Mercaptoethanol	Ferak	-
	TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth	2367.3
	Tris-HCl	AppliChem	A3452
	Tris Ultrapure (Tris Base)	AppliChem	A1086
	Triton® X-100	Roth	3051.3
	Tween® 20	Roth	9127
	WST-1	Roche	11644807001
ASC: Zellkultur, Isolation, CD34- Trennung, Zusätze - OS	DPBS (500ml, ohne Ca/Mg)	PAA	H15-002
	0,25% Trypsin – EDTA (1 x, mit Phenolrot)	Life (Gibco®)	25200
	Albumin solution from bovine serum (BSA) 35 % in DPBS; BioXtra	Sigma	A7979
	Kollagenase (NB4 Standard Grade von Clostridium histolyticum)	SERVA	17454
	Dexamethasone	Sigma	D4902
	DMEM (mit Glucose, GlutaMAX, Pyruvat, Phenolrot, w/o HEPES)	Life (Gibco®)	31966
	DMSO (Dimethylsulfoxid) HYBRI-MAX™	Sigma	D2650
	Ethanol, absolut	ZAP	-
	Fetal Calf Serum (FCS; 0,2 µm sterilfiltriert)	PAN	3302-P281305
	L-Ascorbinsäure	Sigma	A4403
	Penicillin/Streptomycin (P/S) (10.000 U/ml Pen., 10.000 µg/ml Strep.)	Life (Gibco®)	15140-122
	β-Glycerophosphat (disodium salt pentahydrat)	Sigma	50020

	Artikelbezeichnung	Hersteller (Abk.)	Katalog-/ Bestell-Nr.
<i>in vitro</i> Differenzierungsanalysen (unsteril)	8-Hydroxyquinolin	Sigma	252565
	Alizarin Red S	Sigma	A5533
	AMP (2-Amino-2-methyl-1-propanol)	Sigma	08580
	AMPED (2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol)	Sigma	A9754
	Aqua ad injectabilia	Braun	619-3703452
		Promega	G3581
	Essigsäure 100% p.a.	Merck	100063
	Fast Red Violet	Sigma	F3381
	HCl (Salzsäure, 37%ig)	Sigma	H1758
	Isopropanol (2-Propanol)	SERVA	39559.02
	KCl	Merck	104936
	Kristalviolett	Sigma	61135
	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) Hexahydrat	AppliChem	A4425
	NaCl (Natriumchlorid)	Sigma	S5150
	NaOH (Natriumhydroxid) - Natronlauge	Kraft	01034.2000
	Naphthol AS-MX Phosphat	Sigma	N4875
		Sigma	64000
	PFA (Paraformaldehyd)	Sigma	P6148
	PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid)	AppliChem	A0999
	pNPP (4-Nitrophenylphosphat)	AppliChem	A1442
	TBS (Tris Buffered Saline)	Sigma	T5912
	Triton® X-100	Sigma	93420
	Tween® 20	Sigma	P1379

Tabelle 10: verwendete Geräte und Software

	Artikelbezeichnung	Zusatzinformation	Hersteller (Abk.)
Geräte I (Institut für Pharmakologie und Toxikologie)	7500 Fast Real-Time PCR System	Thermocycler für Real-Time PCR	Bio-Rad
	5417 R/C	Zentrifugen	Eppendorf
	anthos htII	microplate reader	Anthos
	BioPhotometer	Photometer	Eppendorf
	CB210	CO ₂ Inkubator	Binder
	ChemiDoc™ XRS+ System	Gelabbildungssystem inkl. Dunkelkammer	Bio-Rad
	Heraeus® HERAguard HPH	passives PCR Kabinett	Thermo
	Mini Trans-Blot® Cell	Geltransferzelle inkl. Einsatz für 2 Gele, 2 Gelhalterungen, Schwämmen und Kühleinsätzen	Bio-Rad
	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Elektrophoresekammer für 4 Gele inkl. Gelgießständen und -rahmen, Glasplatten (1+1,5 mm Dicke) und Kämmen (für 10 Wells)	Bio-Rad
	Multipipette Stream®	Multipipette	Eppendorf
	pipetus®	akkubetriebene Pipettierhilfe	VWR
	Power Pac 200/300	Netzteil (5-200/10-300 V, 0,01-2 A/4-400 mA, 200/75 W (max.), 4 parallele Anschlüsse möglich, konstant U oder I)	Bio-Rad
	PowerPac Basic Power Supply	Netzteil (10-300 V, 4-400 mA, 75 W (max.), 4 parallele Anschlüsse möglich, konstant U oder I)	Bio-Rad
Geräte I	RW5-30V CAT; Stuart® SRT1+9	Rollenmischer	VWR
	Stuart® US151	Magnetrührer	VWR
	Thermomixer Comfort	Thermomixer	Eppendorf
	Titramax 100	Schütteltisch	VWR
	Vortex Genie® 2	Vortex mixer	VWR
Geräte II (Zellbiologie)	VWR Galaxy MiniStar	Mikrozentrifuge	VWR
	5810R	Zentrifuge	Eppendorf
	accu-jet® pro	akkubetriebene Pipettierhilfe	BRAND
	anthos 2010	microplate reader	Anthos
	Axio Scope.A1	aufrechtes Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
	AxioCam ICc1	Mikroskopkamera für Hellfeld	Zeiss
	AxioCam MRc	Mikroskopkamera für Fluoreszenz	Zeiss
	Axiovert 25/40C	inverses Hellfeld-, Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss
	BTR5-12V tube roller mixer	Rollenmischer	Ratek
	CB150	CO ₂ Inkubator	Binder

	Artikelbezeichnung	Zusatzinformation	Hersteller (Abk.)
	Pipetten - Eppendorf Research®	10/100/1000	Eppendorf
	Safeflow 1.2	Laminarbox	Nunc
	Transferpette® S -8 and S -12	Mehrkanalpipetten	BRAND
	Unimax orbital platform shaker	mit Heizeinheit und Inkubatorhaube	Heidolph
	VACUSAFE comfort	Absaugsystem	INTEGRA
Software	7500 Software v2.0	Real-Time Cycler Kontrolle und Datenanalyse	Life (Applied Biosystems®)
	Axiovision 40 Rel. 4.8.0.0	Hellfeld/Phasenkontrastaufnahmen	Zeiss
	Axiovision 40 Rel. 4.8.2.0	Fluoreszenzaufnahmen	Zeiss
	Citavi 3	Literaturverwaltungsprogramm	Swiss
	GraphPad Prism® 5.0	Statistik und Graphenerstellung	GraphPad
	Photoshop CS 8.0.1	Bildbearbeitungsprogramm	Adobe
	Quantity One® 1-D Analysis Software	Bildaufnahme und Videodensitometrische Analysen in Verbindung mit Bio-Rad imaging system	Bio-Rad
	WinRead 2.36	Kontrolle des anthos microplate reader	Anthos

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Antikörper; Molekulargewicht	eingesetzte Verdünnung	Wirt	Hersteller (Abk.)	Katalog-/ Bestell-Nr.
anti-human phospho p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204); 42/44 kDa	1:1000	rabbit	NEB (Cell signaling)	9101
anti-human p44/42 MAPK (ERK1/2); 42/44 kDa	1:1000	rabbit		9102
anti-human phospho JNK (Thr183/Tyr185); 46/54 kDa	1:250	rabbit		9251
anti-human JNK; 46/54 kDa	1:500	rabbit		9252
anti-human phospho Akt (Ser473); 60 kDa	1:250	rabbit		9271
anti-human Akt; 60 kDa	1:500	rabbit		9272
anti-human phospho FAK (Tyr397); 125 kDa	1:500	rabbit		3283
anti-human FAK; 125 kDa	1:1000	rabbit		3285
anti-human β-Actin (monoklonal, Klon AC-74); 42 kDa	1:5000	mouse	Sigma	A5316
anti-human CB ₁ (K-15); 54/63 kDa	1:200	goat	Santa Cruz	sc-10068
anti-human CB ₂ (H-60); 45 kDa	1:200	rabbit	Santa Cruz	sc-25494
anti-human VR1 (N-15); 100 kDa	1:200	goat	Santa Cruz	sc-12500
anti-human GPR55; 37 kDa	1:200	rabbit	BIOZOL (GeneTex)	GTX100376
anti-goat IgG (HRP)	1:500	chicken	R&D	HAF019
anti-mouse IgG (HRP-linked)	1:1000	horse	NEB (Cell signaling)	7076
anti-rabbit IgG (HRP-linked)	1:500-1:1000	goat	NEB (Cell signaling)	7074

Tabelle 12: Liste der Hersteller

Hersteller (Abk.)	Hersteller	Sitz (Stadt)	Land
AAT	AAT Bioquest, Inc.	Sunnyvale	USA (CA)
Adobe	Adobe Systems GmbH	München	Germany
Anthos	anthos Mikrosysteme GmbH	Krefeld	Germany
AppliChem	AppliChem GmbH	Darmstadt	Germany
BD	BD Bioscience, Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	Germany
Binder	Binder GmbH	Tuttlingen	Germany
Biomol	Biomol GmbH	Hamburg	Germany
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	Germany
BIOZOL	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH	Eching	Germany
BRAND	BRAND GmbH + Co KG	Wertheim	Germany
Braun	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	Germany
Cayman	Cayman Chemical Company	Ann Arbor	USA (MI)
Cell Signaling	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers	USA (MA)
Dynal	Dynal Biotech ASA	Oslo	Norway
Enzo	Enzo Life Sciences GmbH	Lörrach	Germany
Eppendorf	Eppendorf AG	Hamburg	Germany
Eurogentec	Eurogentec Germany GmbH	Köln	Germany
Ferak	Ferak Berlin GmbH	Berlin	Germany
Fisher	Fisher Scientific GmbH	Schwerte	Germany

Hersteller (Abk.)	Hersteller	Sitz (Stadt)	Land
Fisher	Fisher Scientific GmbH	Schwerte	Germany
GeneTex	GeneTex Inc.	Irvine	USA (CA)
GraphPad	GraphPad Software, Inc.	La Jolla	USA (CA)
Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Germany
Heidolph	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach	Germany
ibidi	ibidi GmbH	Martinsried	Germany
INTEGRA	Integra Bioscience	Fernwald	Germany
KNF	KNF Neuberger GmbH	Freiburg	Germany
Kraft	Bernd Kraft GmbH	Duisburg	Germany
Liebherr	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH	Ochsenhausen	Germany
Life	Life Technologies GmbH	Darmstadt	Germany
Lipomed	Lipomed GmbH	Weil am Rhein	Germany
Merck	Merck Chemicals GmbH	Schwalbach/Ts.	Germany
Microsoft	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim	Germany
Millipore	Merck Chemicals GmbH	Schwalbach/Ts.	Germany
NEB	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main	Germany
Nunc	Nunc GmbH & Co. KG	Wiesbaden	Germany
PAA	PAA Laboratories GmbH	Cölbe	Germany
PAN	PAN, Biotech GmbH	Aidenbach	Germany
Panasonic	Panasonic Marketing Europe GmbH	Wiesbaden	Germany
PeqLab	PEQLAB Biotechnologie GMBH	Erlangen	Germany
R&D	R&D Systems GmbH	Wiesbaden	Germany
Radiometer	Radiometer Copenhagen	Bagsvaerd	Denmark
Ratek	Ratek Instruments Pty. Ltd.	Victoria	Australia
Roche	Roche Applied Science	Mannheim	Germany
Roth	CARL ROTH GMBH + CO. KG	Karlsruhe	Germany
Santa Cruz	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg	Germany
Sarstedt	SARSTEDT AG & Co.	Nürnbrecht	Germany
Sartorius	Sartorius AG	Göttingen	Germany
Schärfe	Schärfe System GmbH	Reutlingen	Germany
SERVA	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	Germany
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Germany
Star Lab	STARLAB GmbH	Hamburg	Germany
Swiss	Swiss Academic Software GmbH	Wädenswil	Schweiz
Thermo	Thermo Fisher Scientific p/a Perbio Science GmbH	Bonn	Germany
Thermo Electron	Thermo Electron Corporation	Erlangen	Germany
TOCRIS	Tocris Bioscience	Bristol	UK
Quiagen	QUIAGEN GmbH	Hilden	Germany
VWR	VWR International GmbH	Hannover	Germany
YMC	YMC Europe GmbH	Weselerwald	Germany
ZAP	Zentralapotheke Universitätsklinikum	Rostock	Germany
Zeiss	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Göttingen	Germany

4 Ergebnisse

4.1 Beeinflussung der Migration durch Cannabinoide

4.1.1 CBD fördert zeit- und konzentrationsabhängig die Migration von ASC

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf Effekten des nicht psychoaktiven Cannabinoids CBD, weshalb die Migration der ASC in erster Linie unter Einfluss von CBD untersucht wurde.

Zur Untersuchung und Quantifizierung der Migration wurde ein modifizierter *Boyden Chamber Assay* (siehe 2.2.2, Seite 28) gewählt. Die ASC von zwei Spendern wurden mit 3 μM CBD oder Vehikel über einen Zeitraum von 48 h inkubiert und die Migration nach 2, 6, 24 und 48 h analysiert (siehe Abbildung 14 A). CBD übte zu allen Zeitpunkten einen promigrativen Effekt auf die ASC aus. Nach 6 h stieg die Migration auf 470 %. Zu diesem Zeitpunkt wurden deshalb alle folgenden Boyden-Chamber-Analysen durchgeführt. Die promigrative Wirkung von CBD wurde auch bei weiteren Spendern bestätigt (siehe Abbildung 14 B), wobei die Steigerung mindestens 213 % (Spender B) und maximal 613 % (Spender A) und im Mittel 347 ± 154 % (MW \pm SD) betrug. Nach 6 h Inkubation mit mehreren Konzentrationen von CBD (0,01–3 μM) konnte auch eine Konzentrationsabhängigkeit für den promigrativen Effekt gezeigt werden (siehe Abbildung 14 C).

Ob die Wirkung von CBD auf einer Steigerung der Proliferationsrate beruhte, wurde in einem WST-1-Proliferationstest untersucht. Dafür wurden 20.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät, nach 12 h stimuliert und nach 6 h die relative Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Es konnte keine signifikanten Änderung im Vergleich zum Vehikel ermittelt werden (siehe Abbildung 14 D), d.h. der promigrative Effekt von CBD beruht nicht auf einer Steigerung der Proliferation der ASC.

Ergänzend wurde die Migration auch in einem sog. *Scratch Wound Healing Assay* (siehe 2.2.1, Seite 28) untersucht. Nach 6 h waren nur einzelne migrierte ASC zu beobachten, nach 18 h (siehe Abbildung 14 E) und 24 h (nicht gezeigt) konnte die Wiederbesiedlung und nach 48 h das Schließen des *Scratches* (nicht gezeigt) dokumentiert werden. Auch in diesem Assay konnte eine promigrative Wirkung von CBD gezeigt werden. Da dieser Assay größeren Schwankungen unterlag (Breite des manuell gezogenen Kratzers; Dokumentation derselben Stelle des *Scratch* über mehrere Zeitpunkte; Quantifizierbarkeit) wurden alle weitere quantitativen Analysen im *Boyden Chamber Assay* durchgeführt.

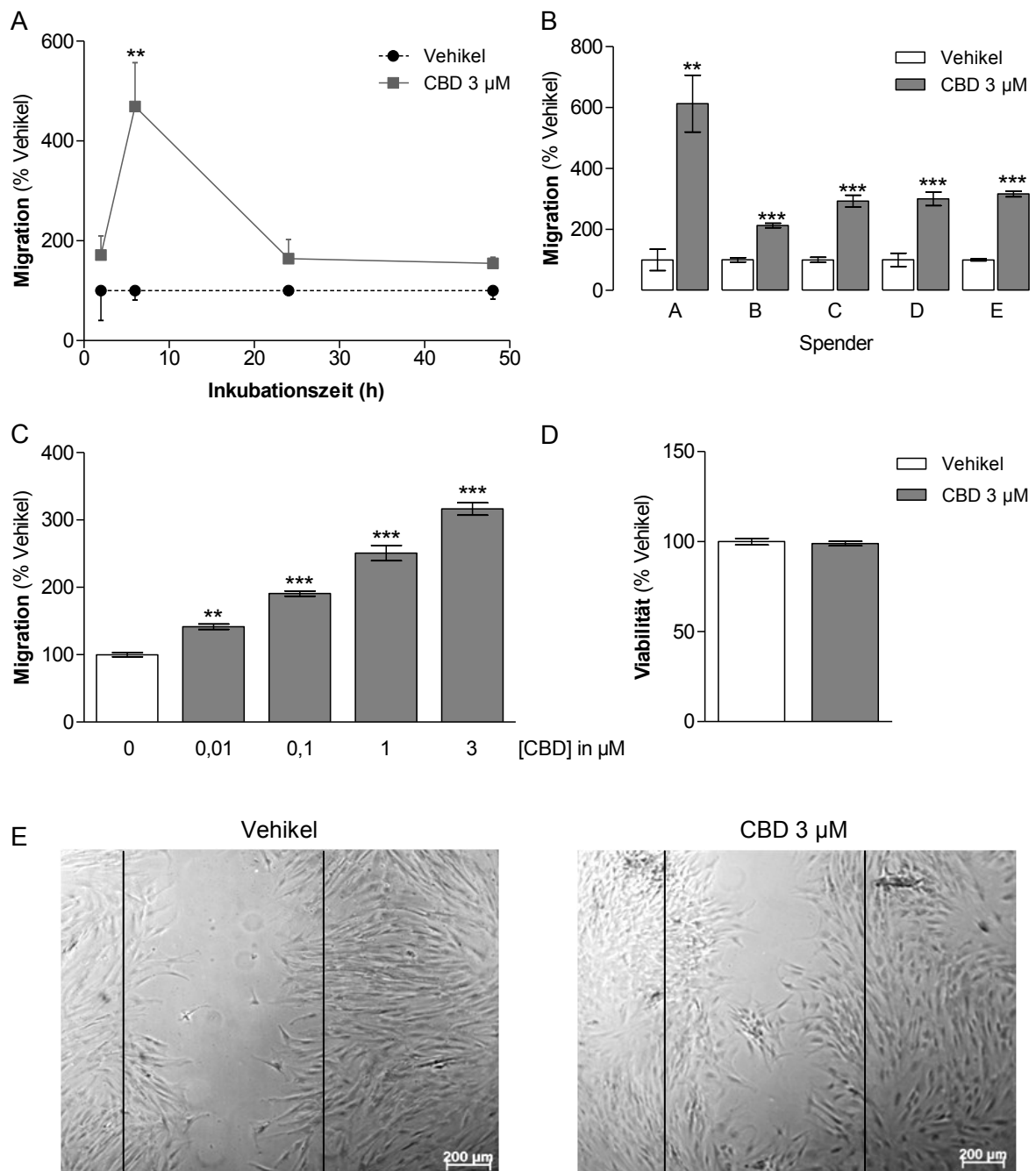


Abbildung 14: Einfluss von CBD auf die Migration von ASC.

A, Zeitverlauf der Migration (*Boyden Chamber Assay*) von ASC, welche über 48 h mit CBD oder Vehikel inkubiert wurden. **B**, Variabilität des promigrativen Effektes von CBD zwischen mehreren Stammzellspendern. ASC von fünf Spendern wurden mit CBD oder Vehikel für 6 h inkubiert und anschließend die Migration im *Boyden Chamber Assay* quantifiziert. **C**, konzentrationsabhängiger Effekt von CBD auf die Migration (*Boyden Chamber Assay*) von ASC nach einer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von CBD oder Vehikel für 6 h. **D**, Viabilität der ASC nach 6 h Inkubation mit CBD oder Vehikel, WST-1-Proliferationstest. **E**, Phasenkontrastaufnahmen von ASC, die nach 18 h Inkubation mit CBD oder Vehikel, in den vorher verwundeten Bereich (*Scratch*) gewandert sind.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ (A, 2-h- und 48-h-Inkubation, 1 Spender), $n = 3-4$ pro Spender (B), $n = 4$ (C, D, je 1 Spender), $n = 8$ (A, 2 Spender) Experimenten; Student's t-Test oder ANOVA mit Dunnet's Post-hoc-Test (C); ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel.

4.1.2 CBD steigert die Migration durch Aktivierung der ERK

Da eine Involvement der ERK in die Migration von Zellen (siehe 1.3.1; Seite 14) mehrmals gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss des MAPK/ERK Kinase (MEK)-Inhibitors PD98059 auf den promigrativen Effekt von CBD untersucht. Nach 1 h Präinkubation mit 1 μ M PD98059 und anschließender Inkubation mit 3 μ M CBD oder Vehikel für 6 h, wurde die Migration der ASC mittels *Boyden Chamber Assay* analysiert. Die promigrative Wirkung von CBD wurde durch PD98059 fast vollständig aufgehoben, wobei der Inhibitor keinen Eigeneffekt auf die Migration von ASC (siehe Abbildung 15 A) und keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen ausübte (siehe Abbildung 15 C). Die ERK ist demzufolge auch kausal in die CBD-induzierte Migration von ASC involviert.

In einem Zeitverlauf der ERK-Aktivierung auf Proteinebene über einen Zeitraum von 6 h (siehe Abbildung 21, Seite 66) konnte eine Aktivierung bereits ab 5 min nachgewiesen werden. Als Messzeitpunkt zur ERK-Aktivierung durch CBD wurde 1 h gewählt (Begründung siehe 4.1.5.2, Seite 64). Nach 3 h Serumentzug, 1 h Präinkubation mit 1 μ M PD98059 und anschließender Inkubation der ASC mit 3 μ M CBD oder Vehikel für 1 h, wurden die ASC lysiert. Mittels Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus diesen Zelllysaten konnte, nach Normalisierung der densitometrischen Daten der pERK auf die ERK, die Aktivierung in Prozent der Kontrolle bestimmt werden. Die CBD-induzierte ERK-Aktivierung wurde durch PD98059 erwartungsgemäß gehemmt, wobei PD98059 keinen Effekt auf die basale Migration von ASC ausübte (siehe Abbildung 15 B). Desweiteren konnte auch eine konzentrationsabhängige Aktivierung der ERK durch CBD (siehe Abbildung 15 D) gezeigt werden.

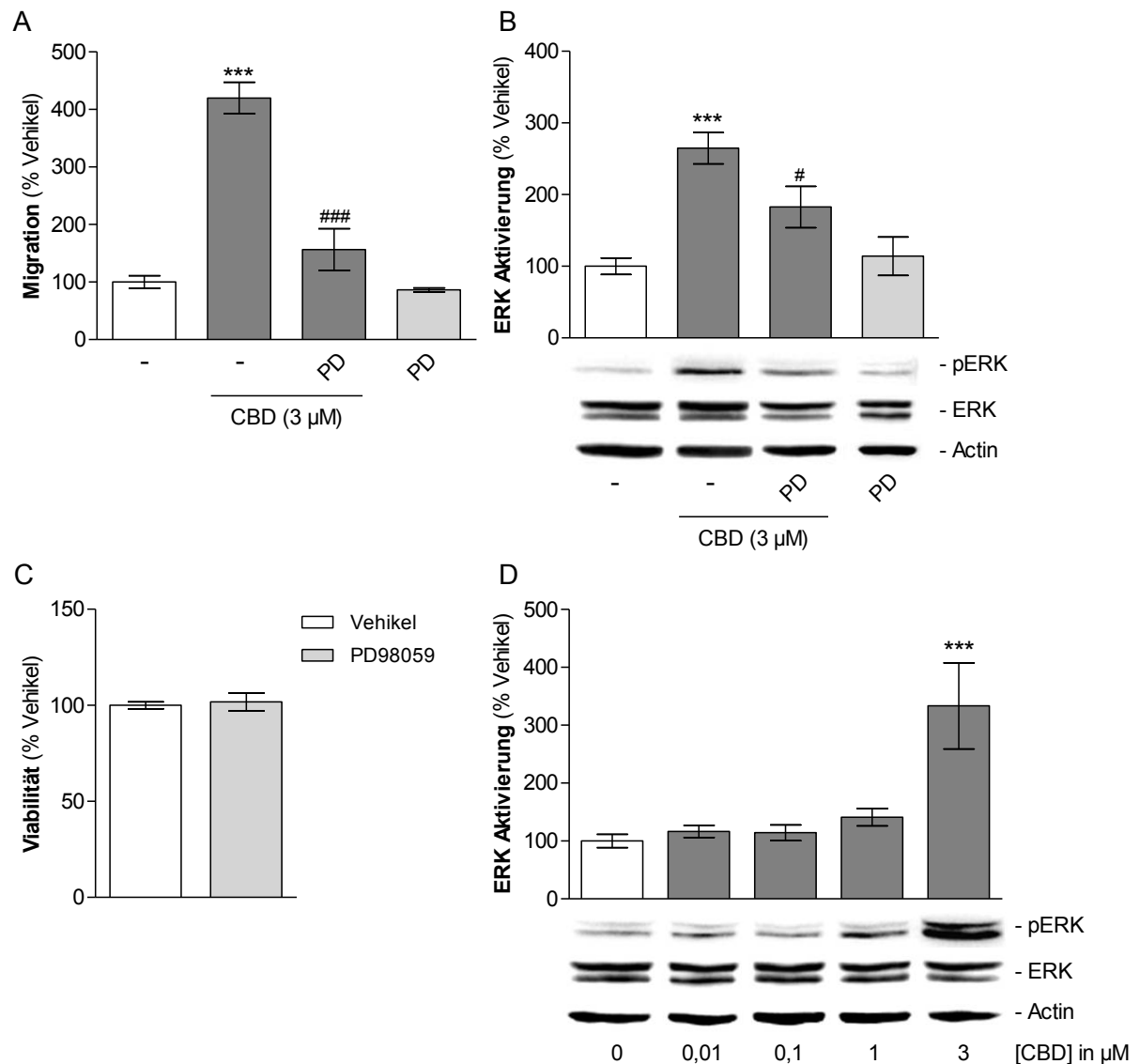


Abbildung 15: Involvierung der ERK in die CBD-induzierte Migration von ASC.

A, Beteiligung der ERK am promigrativen Effekt von CBD und grundsätzliche Rolle bei der Migration von ASC. ASC wurden 1 h mit 1 µM PD98059 (PD; MAPK/ERK Kinase-Inhibitor) oder Vehikel präinkubiert und anschließend mit CBD oder Vehikel stimuliert. Nach 6 h wurde mittels *Boyden Chamber Assay* die Migration analysiert. **B**, Einfluss von PD98059 auf die CBD-induzierte und die basale ERK-Aktivierung nach 1 h. Die Messung erfolgte mittels Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten von ASC. **C**, Viabilität der ASC nach 7 h Inkubation mit PD98059 oder Vehikel, WST-1-Proliferationstest. **D**, Konzentrationsabhängige Aktivierung der ERK nach einer Inkubation der ASC mit 0,01, 0,1, 1 und 3 µM CBD für 1 h. Die Analyse erfolgte via *Western Blot* der Zelllysate analog zu B.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ (A, 2 Spender, außer Analyse von PD ohne CBD [$n = 4$, 1 Spender]), $n = 11$ (B, 3 Spender, außer Analyse von PD ohne CBD [$n = 6$, 2 Spender]), $n = 4$ (C, 1 Spender), $n = 6$ (D, 2 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (A), Dunnet's Post-hoc-Test (C) oder Student's t-Test (A, B); *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; # $P \leq 0,05$, ### $P \leq 0,001$ vs. CBD-behandelte Zellen.

4.1.3 CBD vermittelt seine promigrative Wirkung über GPR55 und CB₂

Als nächstes sollte untersucht werden, ob CBD seine Effekte auf die Migration von ASC über Cannabinoidrezeptoren, GPR55 und TRPV1 (siehe 1.2.1; ab Seite 7) vermittelt und ob dies mit einer entsprechenden ERK-Aktivierung korreliert.

Da es bisher keine Studien an ASC zur Expression der untersuchten Rezeptoren und des Ionenkanals gibt, wurde dies hier erstmalig auf Proteinebene überprüft. In Western-Blot-Analysen der isolierten Membranfraktion (siehe 2.3.1.2, Seite 30) der ASC von mehreren Spendern in Passage 4 konnten CB₁ (54 kDa), CB₂ (45 kDa), GPR55 (37 kDa) und TRPV1 (100 kDa) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16 C, eingefügte Bilder).

Um eine kausale Involvierung der Rezeptoren in den promigrativen Effekt von CBD zu analysieren, wurden ASC 1 h mit je 1 µM AM-251 (Antagonist am CB₁), AM-630 (Antagonist am CB₂), Capsazepin (Antagonist am TRPV1) und O-1602 (Agonist am GPR55) präinkubiert und anschließend mit 3 µM CBD oder Vehikel stimuliert. Nach 6 h wurde die Migration mittels *Boyden Chamber Assay* (Abbildung 16, Seite 59) und nach 1 h die ERK-Aktivierung mittels *Western Blot* (siehe Abbildung 17, Seite 60) analysiert. In WST-Tests konnte gezeigt werden, dass keine der genannten Substanzen nach 7 h einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der ASC ausübte (siehe Abbildung 16 C).

Der promigrative Effekt von CBD bei Hemmung des CB₂ und Aktivierung des GPR55 wurde signifikant um 69 % bzw. 92 % inhibiert (siehe Abbildung 16 A). Über den CB₁ und den TRPV1 wurden geringere und nicht signifikante Effekte vermittelt (Hemmung um 19 % bzw. 39 %; siehe Abbildung 16 A). Bei einem Test auf Eigeneffekte von AM-251, AM-630, Capsazepin und O-1602 wurde ausschließlich bei Hemmung des TRPV1 eine Reduzierung des basalen Migrationsverhaltens von ASC nachgewiesen (siehe Abbildung 16 B).

Bei der Aktivierung der ERK ergab sich das gleiche Schema der Hemmung des CBD-Effektes (siehe Abbildung 17 A, B). Die CBD-induzierte ERK-Aktivierung wurde bei Hemmung des CB₂ um 37 % und bei Aktivierung des GPR55 um 54 % signifikant reduziert (siehe Abbildung 17 B). Der CB₁-Rezeptorantagonist AM-251 reduzierte den CBD-Effekt um 27 % und eine Hemmung des TRPV1 steigerte die CBD-induzierte ERK-Aktivierung um 5 %. Western Blot-Analysen der Rezeptorantagonisten und O-1602 in Abwesenheit von CBD ergaben keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung der ERK (siehe Abbildung 17 C).

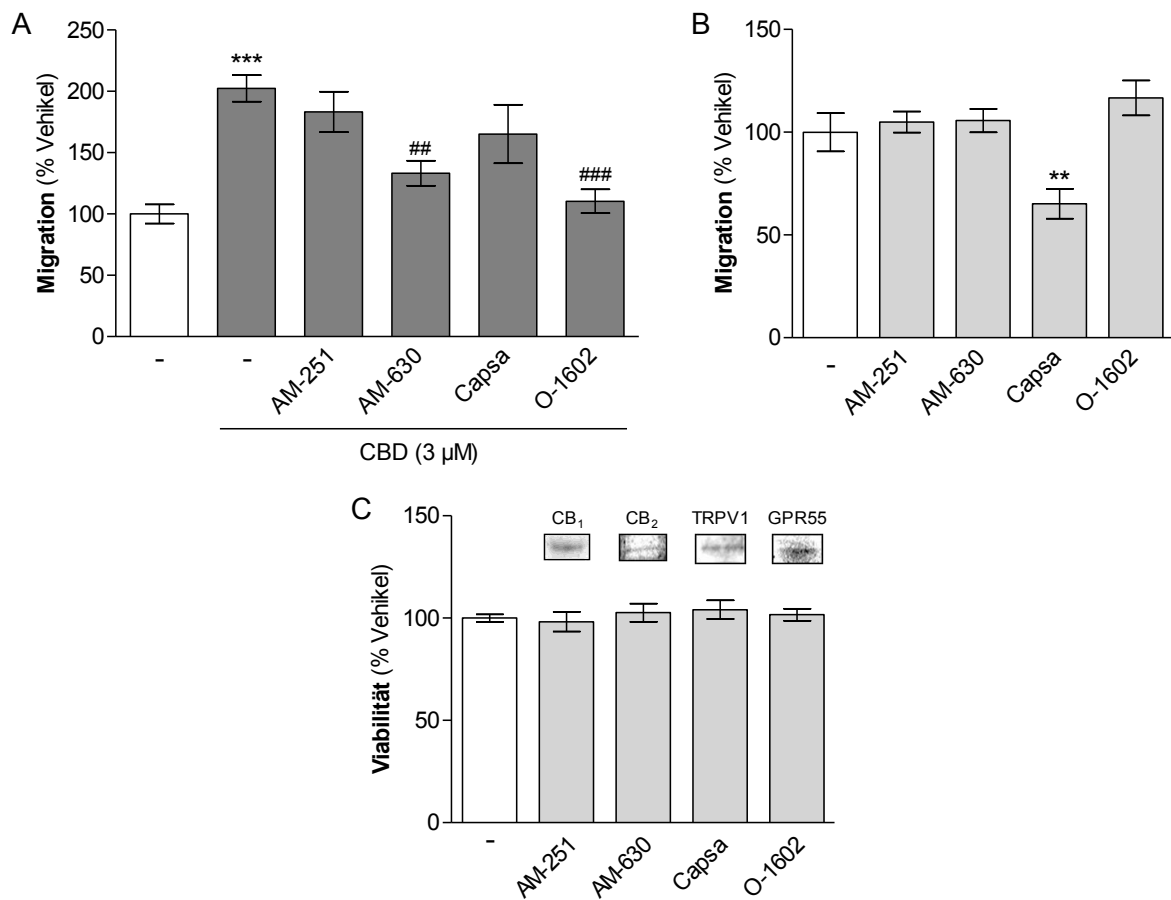


Abbildung 16: Cannabinoidrezeptor-Involvierung in den promigrativen Effekt von CBD auf ASC.

A, Einfluss der Antagonisten AM-251 (CB₁), AM-630 (CB₂) und Capsazepin (Capsa; TRPV1) und des Rezeptoragonisten O-1602 (GPR55) auf die CBD-induzierte Migration von ASC. Die Analyse erfolgte nach 6 h im *Boyden Chamber Assay* und die Konzentration der Antagonisten und Agonisten betrug jeweils 1 μ M. Eigeneffekte der in A verwendeten Rezeptorantagonisten und -agonisten auf die Migration (**B**) und Viabilität (**C**). **C, Insert**, Nachweis der Rezeptorexpression auf Proteinebene nach 6 h Inkubation mit 3 μ M CBD mittels Western-Blot-Analyse der Membranfraktion von ASC in Passage 4.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 16$ (A, 4 Spender, außer Analyse von Capsa und O-1602 [$n = 12$, 3 Spender]), $n = 8$ (B, 2 Spender), $n = 4$ (C, 1 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (A), Dunnet's Post-hoc-Test (B, C); ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. CBD-behandelte Zellen.

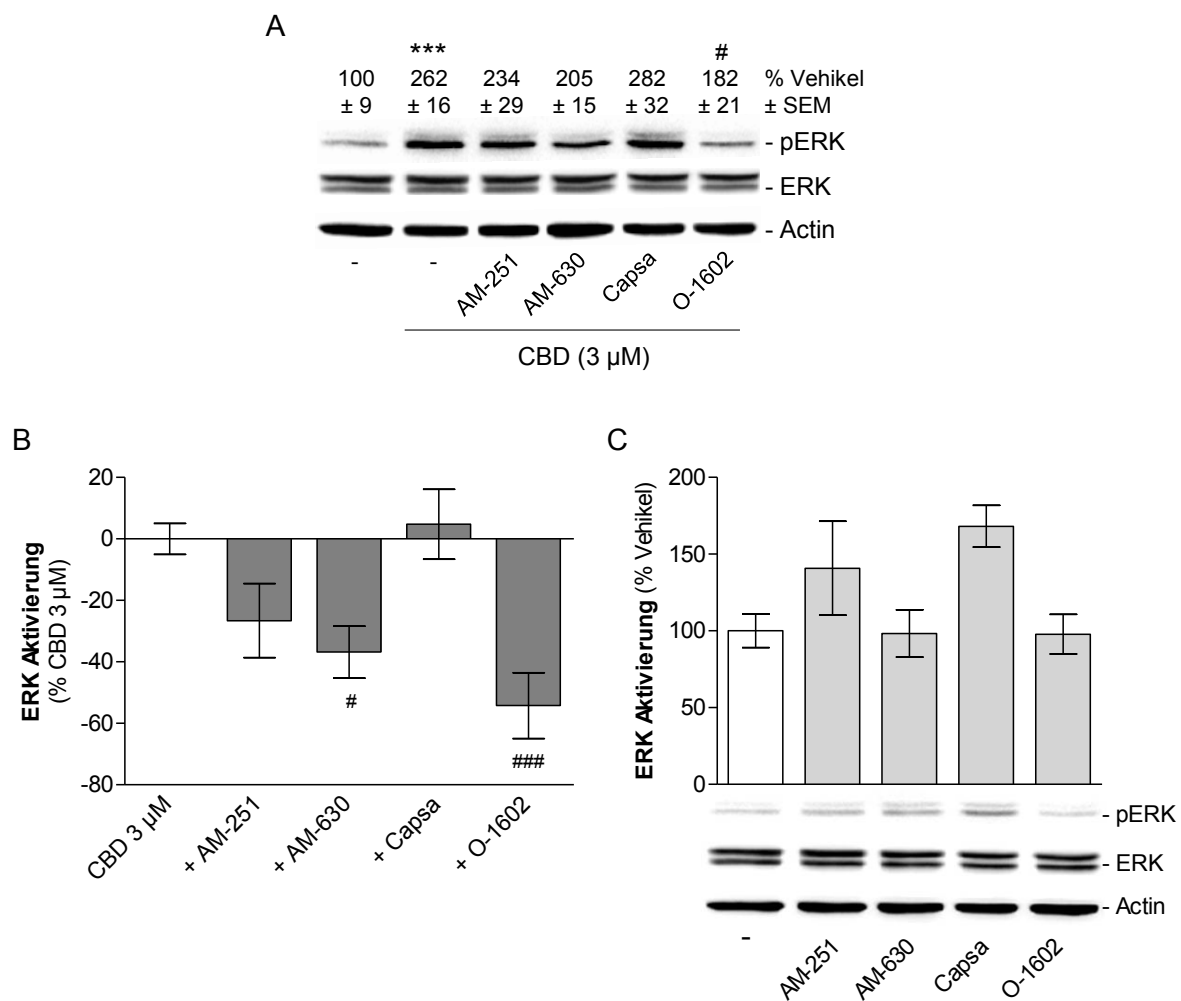


Abbildung 17: Rolle der Cannabinoidrezeptoren bei der CBD-induzierten ERK-Aktivierung in ASC.

A, Einfluss der Antagonisten AM-251 (CB₁), AM-630 (CB₂) und Capsazepin (Capsa; TRPV1) und des Rezeptoragonisten O-1602 (GPR55) auf die CBD-induzierte ERK-Aktivierung in ASC. Die Konzentration der Antagonisten und Agonisten betrug jeweils 1 μ M und die Analyse erfolgte nach 1 h mittels Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten von ASC. **B**, genaue Darstellung der Inhibierung des CBD-Effektes durch die jeweiligen Antagonisten bzw. Agonisten. **C**, Effekte der verwendeten Rezeptorantagonisten und -agonisten auf die basale ERK-Aktivierung.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 15$ (A, B, je 4 Spender, außer Analyse von AM-251 & Capsa [$n = 11$, 3 Spender]), $n = 4$ (C, 1 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen Blot. ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test (A, B), Dunnet's Post-hoc-Test (C); *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; # $P \leq 0,05$, ### $P \leq 0,001$ vs. CBD-behandelte Zellen.

4.1.4 Beteiligung des GPR55 und des CB₂ bei der ERK-vermittelten Migration von ASC

Um zu überprüfen, ob GPR55 und CB₂ in den ERK-vermittelten promigrativen Effekt beteiligt sind, wurden ein weiterer GPR55-Antagonist O-1918 und ein weiterer CB₂-Agonist JWH-133 bezüglich ihrer Wirkung auf Migration und ERK-Aktivierung getestet. Die ASC wurden analog zu den Versuchen mit CBD mit 1 µM der jeweiligen Rezeptorantagonisten bzw. -agonisten präinkubiert und dann mit 3 µM O-1918 bzw. JWH-133 oder Vehikel stimuliert. Keine der beiden Substanzen hatte eine signifikante Wirkung auf die Viabilität der ASC (siehe Abbildung 19 A, Seite 63). Die Migration wurde immer 6 h nach Stimulation im *Boyden Chamber Assay* quantifiziert und die ERK-Aktivierung nach 1 h mittels *Western Blot* der Zelllysate analysiert.

Der GPR55-Antagonist O-1918 steigerte konzentrationsabhängig die Migration in ASC, wobei dieser Effekt vollständig durch Präinkubation mit dem GPR55-Agonisten O-1602 aufgehoben wurde (siehe Abbildung 18 A). Eine Präinkubation der ASC mit dem MAPK/ERK Kinase-Inhibitor PD98059 führte in Übereinstimmung mit diesen Befunden zu einer Umkehr der promigrativen Wirkung von O-1918 (siehe Abbildung 18 B). Ebenso wie der GPR55-Antagonist CBD führte auch O-1918 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Migration und ERK-Aktivierung (siehe Abbildung 18 C). Diese O-1918-induzierte ERK-Aktivierung wurde teilweise durch O-1602 bzw. vollständig durch PD98059 gehemmt (siehe Abbildung 18 D).

In Übereinstimmung mit der zuvor gezeigten Involvierung des CB₂-Rezeptors bei der CBD-induzierten Migration und ERK-Aktivierung führte JWH-133 zu einer Induktion der Migration und ERK-Aktivierung, die durch den CB₂-Antagonisten AM-630 und PD98059 gehemmt wurden (siehe Abbildung 19 B+C, Seite 63).

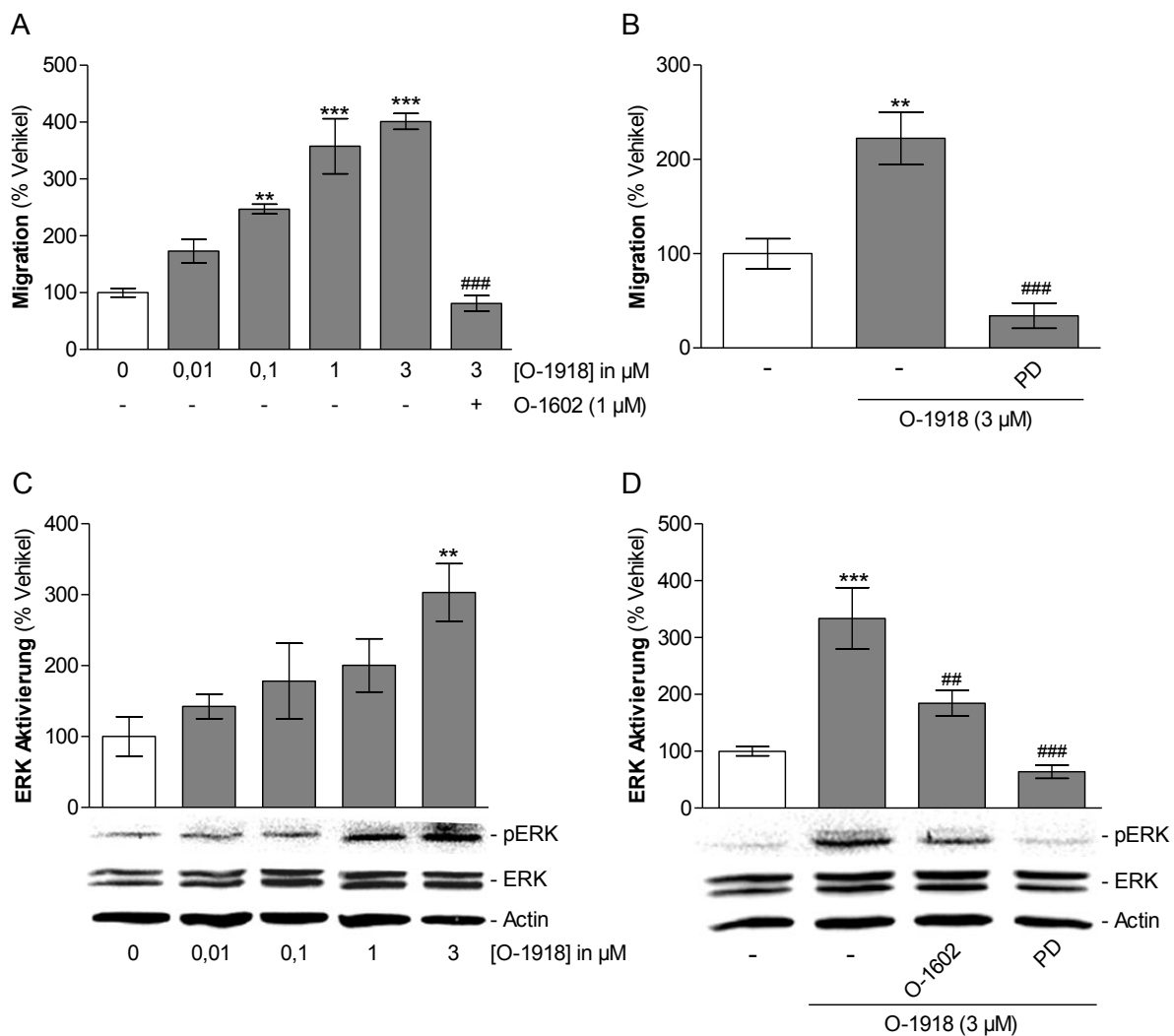


Abbildung 18: Der GPR55-Antagonist O-1918 steigert die Migration und Aktivierung der ERK in ASC.

A, Konzentrationsabhängiger Effekt von O-1918 auf die Migration von ASC und dessen Beeinflussung durch den GPR55-Agonisten O-1602 (gemessen nach 6 h im *Boyden chamber*). **B**, Einfluss des MAPK/ERK Kinase (MEK) -Inhibitors PD98059 (PD; 1 µM) auf die promigrative Wirkung von O-1918. **C**, Aktivierung der ERK nach Stimulation der ASC mit 0,01, 0,1, 1 und 3 µM O-1918 oder Vehikel. Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten von ASC erfolgten nach 1 h. **D**, Einfluss von O-1602 und PD (je 1 µM) auf die O-1918-induzierte Aktivierung der ERK.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ (A, B, je 1 Spender), $n = 5$ (B, 2 Spender), $n = 7$ (C, 2 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (A, B, D) oder Dunnet's Post-hoc-Test (C); ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. O-1918-behandelte Zellen.

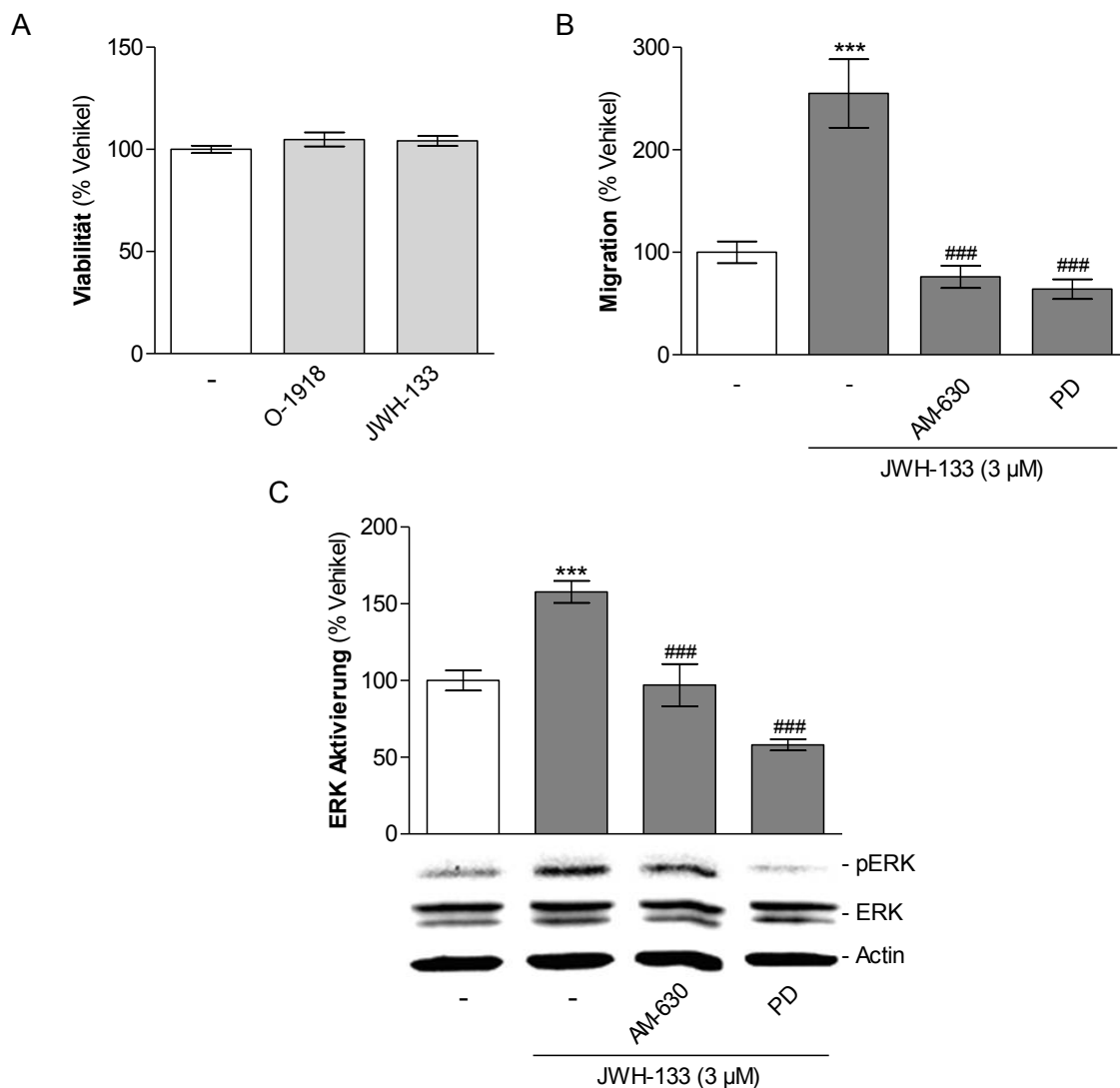


Abbildung 19: Migrationssteigerung und ERK-Aktivierung durch den selektiven CB₂-Agonisten JWH-133

A, Viabilität der ASC nach 6 h Inkubation mit O-1918, JWH-133 oder Vehikel, ermittelt im WST-1-Proliferationstest **B**, **C**, Wirkung des selektiven CB₂-Agonisten JWH-133 auf die Migration (**B**) und ERK-Aktivierung (**C**) von ASC; und deren Modifikation durch den CB₂-Antagonisten AM-630 und den MEK-Inhibitor PD98059 (je 1 μ M und 1 h Präinkubation). Messung der Migration erfolgte nach 6 h im *Boyden Chamber Assay*. Die ERK-Aktivierung wurde nach 1 h via Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten von ASC ermittelt.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ (A, B, je 1 Spender), $n = 8$ (C, 3 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test (A) oder Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (B, C); *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ### $P \leq 0,001$ vs. JWH-133-behandelte Zellen.

4.1.5 PI3K und JNK sind am promigrativen Effekt von CBD beteiligt

Für die Analyse der Signalkaskade, welche der promigrativen Wirkung von CBD zugrunde liegt, wurden weitere Kinasen, deren Beteiligung an migrativen Prozessen bereits gezeigt wurde (siehe 1.3.1, Seite 14), auf eine mögliche Involvierung untersucht. Analysiert wurden weitere MAPK wie die JNK und die MAPK p38, und außerdem die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivierbare PI3K und die bei der Adhäsion und Migration von Zellen beteiligte *Focal adhesion kinase* (FAK).

4.1.5.1 Beeinflussung der Migration

Die nötigen Migrationsversuche erfolgten analog zu den bisher beschriebenen Experimenten. Die ASC wurden mit je 5 μM LY294002 (LY, PI3K-Inhibitor), SP600125 (SP, JNK-Inhibitor), PP2 (Src-Tyrosinkinase-Inhibitor, vorgeschalteter FAK-Inhibitor) oder 1 μM SB203580 (SB, p38-Inhibitor) für 1 h präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 μM CBD oder Vehikel stimuliert und nach 6 h Inkubationszeit das Migrationsverhalten mittels *Boyden Chamber Assay* ausgewertet.

Bei Inhibierung der PI3K und der JNK wurde die CBD-induzierte Migration der ASC vollständig bzw. fast vollständig gehemmt (siehe Abbildung 20 A). Weder LY294002 noch SP600125 übten Eigeneffekte auf die Viabilität der ASC innerhalb von 7 h aus (VK: $100 \pm 2 \%$; LY294002: $103 \pm 7 \%$; SP600125: $107 \pm 3 \%$; MW \pm SEM; n = 4; 1 Spender). Die Hemmung der FAK und p38 hatte keinen Einfluss auf den CBD-Effekt (siehe Abbildung 20 A). Es konnte gezeigt werden, dass keiner der hier getesteten Inhibitoren einen signifikanten Eigeneffekt auf das basale Migrationsverhalten der ASC ausübte (siehe Abbildung 20 B).

4.1.5.2 Aktivierung von Akt/PKB und JNK

Um eine Sequenz in der Aktivierung der Kinasen aufzeigen zu können, wurde zuerst der Zeitverlauf ihrer Aktivierung untersucht. Daraus konnten die geeigneten Zeitfenster zur Durchführung anschließender Inhibitorexperimenten ermittelt werden.

Dafür wurden die ASC nach 3 h Serumentzug mit 3 μM CBD oder Vehikel bis über einen Zeitraum von 6 h inkubiert. Nach 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4 und 6 h wurden die Zellen lysiert und davon Western-Blot-Analysen der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form der jeweiligen Kinasen durchgeführt.

In Abbildung 21 (Seite 66) sind alle Ergebnisse der Aktivierungsverläufe zusammengefasst. Unter A sind repräsentative Proteinbanden aller untersuchten Kinasen zusammengestellt, welche den in B dargestellten Zeitverläufen der densitometrischen Quantifizierungen zugrundeliegen.

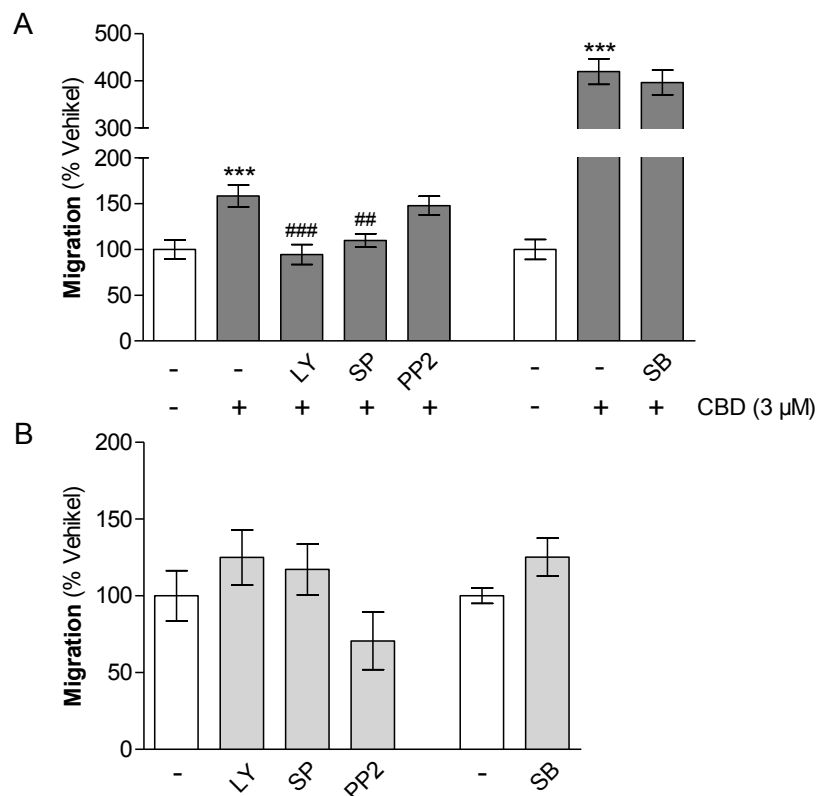


Abbildung 20: PI3K und JNK, aber weder FAK noch die MAPK p38, sind an dem promigrativen Effekt von CBD beteiligt.

Einfluss von LY294002 (LY, PI3K-Inhibitor), SP600125 (SP, JNK-Inhibitor), PP2 (vorgeschalteter FAK-Inhibitor) und SB203580 (SB, MAPK p38-Inhibitor) auf die CBD-induzierte (**A**) und basale (**B**) Migration von ASC. Nach 1 h Präinkubation mit je 5 μ M LY, SP und PP2 oder 1 μ M SB wurden die ASC mit CBD (**A**) oder Vehikel (**A, B**) stimuliert. Nach 6 h erfolgte die Migrationsanalyse mittels *Boyden Chamber Assay*.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 10$ (**A**, 3 Spender, außer Analyse von SB +/- CBD mit entsprechendem Vehikel [$n = 8$, 2 Spender]), $n = 6$ (**B**, 2 Spender, außer Analyse von SB - CBD mit entsprechendem Vehikel [$n = 4$, 1 Spender]) Experimenten. ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (**A**) oder Dunnet's Post-hoc-Test (**B**); *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ### $P \leq 0,001$, ## $P \leq 0,01$ vs. CBD-behandelte Zellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass Akt/PKB nur zu frühen (15–60 min), FAK ausschließlich zu späteren Zeitpunkten (2–6 h) und ERK und p46-JNK über den kompletten Inkubationszeitraum (Peak nach 4 h) aktiviert wurden. Bei der phosphorylierten JNK wurde die p54-JNK in den ASC nur sehr schwach aktiviert und deshalb nicht für eine quantitative Auswertung herangezogen (siehe Abbildung 21 A). Alle späteren Quantifizierungen beziehen sich auf die p46-JNK, welche im Weiteren als JNK bezeichnet wird.

Als Zeitpunkt zur Analyse einer möglichen Sequenz bzw. Rezeptorinvolvierung wurde die Inkubationszeit gewählt, innerhalb derer die früheste bzw. stärkste signifikante Induktion der Kinase durch CBD ermittelt wurde. Bei Akt/PKB war dies nach 0,5 h. ERK stieg nahezu linear innerhalb 1 h auf ~200 % und anschließend um nur weitere 50 % nach 4 h - deshalb wurde eine Inkubationszeit von 1 h für weitere Analysen bestimmt. Da es bei der JNK einen deutlichen und starken Peak nach 4 h gab, wurden alle folgenden Untersuchungen auch zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

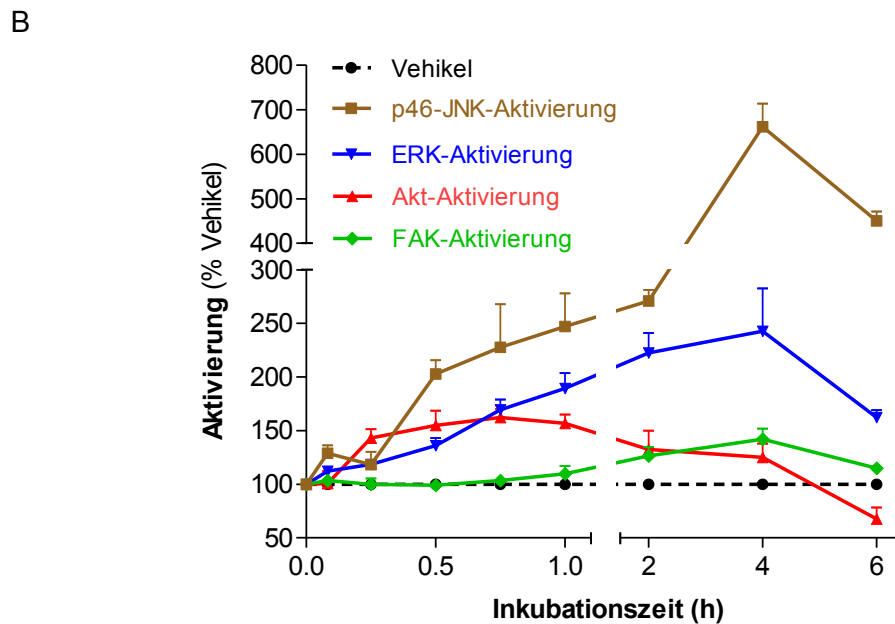
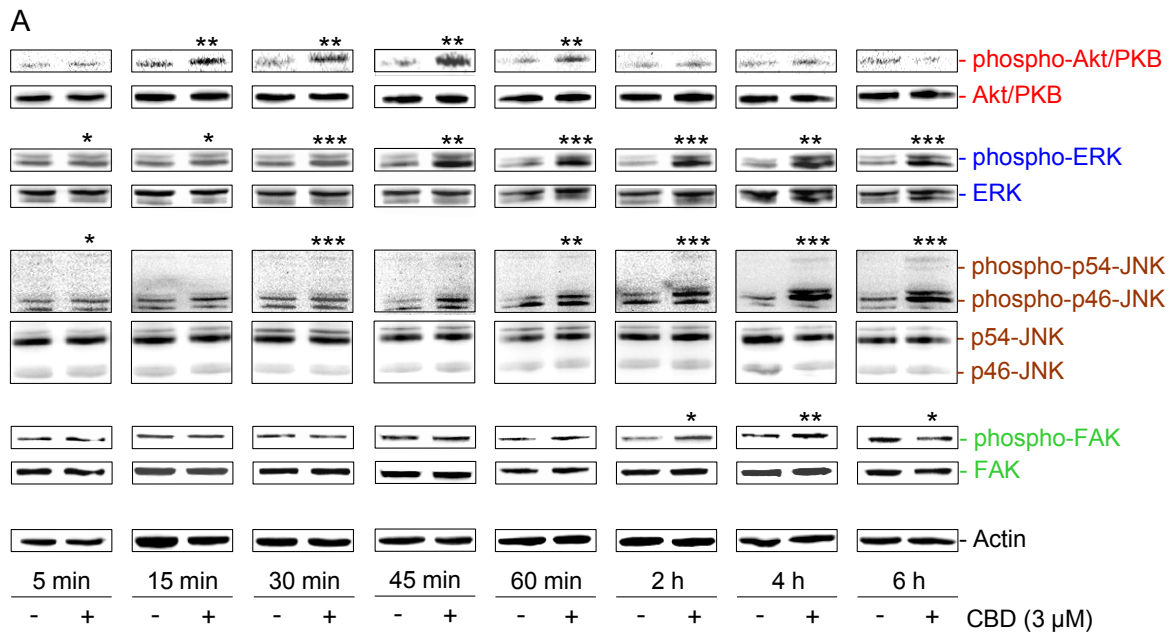


Abbildung 21: Zeitverlauf der CBD-induzierten Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB), ERK, JNK und FAK

Western-Blot-Analysen der jeweils phosphorylierten (phospho- bzw. p-) und nicht-phosphorylierten Form der Kinasen aus Zelllysaten von ASC von zwei Spendern, welche bis zu 6 h mit CBD oder Vehikel stimuliert wurden. **A**, Repräsentative Darstellung der drei Kinasen und Actin von *Western Blots* eines Spenders. **B**, Zeitverlauf der Aktivierung von Akt/PKB (Hauptaktivierungsprodukt der PI3K), ERK, p46-JNK und FAK. Western-Blot-Analysen wurden nach 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4 und 6 h durchgeführt.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ (A, B, 2 Spender, außer 5-min- und 45-min-Inkubation [$n = 3$, 1 Spender]). Student's *t*-Test; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs. Vehikel; Auf die Darstellung der Signifikanzen wurde in B zugunsten einer besseren Übersicht verzichtet. Diese sind dafür in A über den Proteinbanden abgebildet

In den anschließenden Inhibitorexperimenten konnte nun eine mögliche Reihenfolge in den Kinaseaktivierungen untersucht werden.

Wie in Abbildung 22 auf Seite 68 erkennbar, wurde die CBD-induzierte Akt/PKB-Aktivierung bei Inhibierung der PI3K vollständig und bei Inhibierung der JNK fast vollständig aufgehoben (A, links; D). Eine Hemmung der ERK-Aktivierung hatte hingegen keinen Effekt.

Die durch CBD induzierte ERK-Aktivierung wurde durch LY294002 (Akt/PKB) und SP600125 (JNK) teilweise und durch PD98059 fast vollständig gehemmt (siehe Abbildung 22 B, links; E). Diese Inhibierungseffekte waren auch nach 4 h Inkubationszeit noch festzustellen, jedoch ohne Signifikanz (Reduktion der CBD-induzierten ERK-Phosphorylierung um ~23 % [LY294009] bzw. ~25 % [SP600126]; 3 Spender; Daten nicht gezeigt).

Die CBD-induzierte JNK-Aktivierung wurde durch SP600125 um 50 % und durch PD98059 vollständig gehemmt. Eine Inhibierung der PI3K hatte keinen Effekt (siehe Abbildung 22 C links; F).

Die in Abbildung 22 A-C auf der rechten Seite dargestellten basalen Proteinexpressionen nach alleiniger Stimulation mit den Inhibitoren lassen erkennen, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 und der JNK-Inhibitor SP600125 die Akt/PKB-Aktivierung hemmten und der MEK-Inhibitor PD98059 die Aktivierung von JNK inhibierte. Diese Hemmeffekte auf die basale Proteinaktivierung schließen eine Aktivierung von Akt/PKB bzw. JNK durch JNK bzw. ERK aus.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibierungen von PI3K und JNK in einer partiellen Hemmung der CBD-induzierten ERK-Aktivierung resultierten. Hingegen hatte eine Inhibierung der MEK/ERK-Kaskade keinen spezifischen Effekt auf die CBD-induzierte Aktivierung von Akt/PKB und JNK. Somit sind PI3K/Akt und JNK nach den vorliegenden Ergebnissen mögliche Upstream-Mediatoren der CBD-induzierten ERK-Aktivierung.

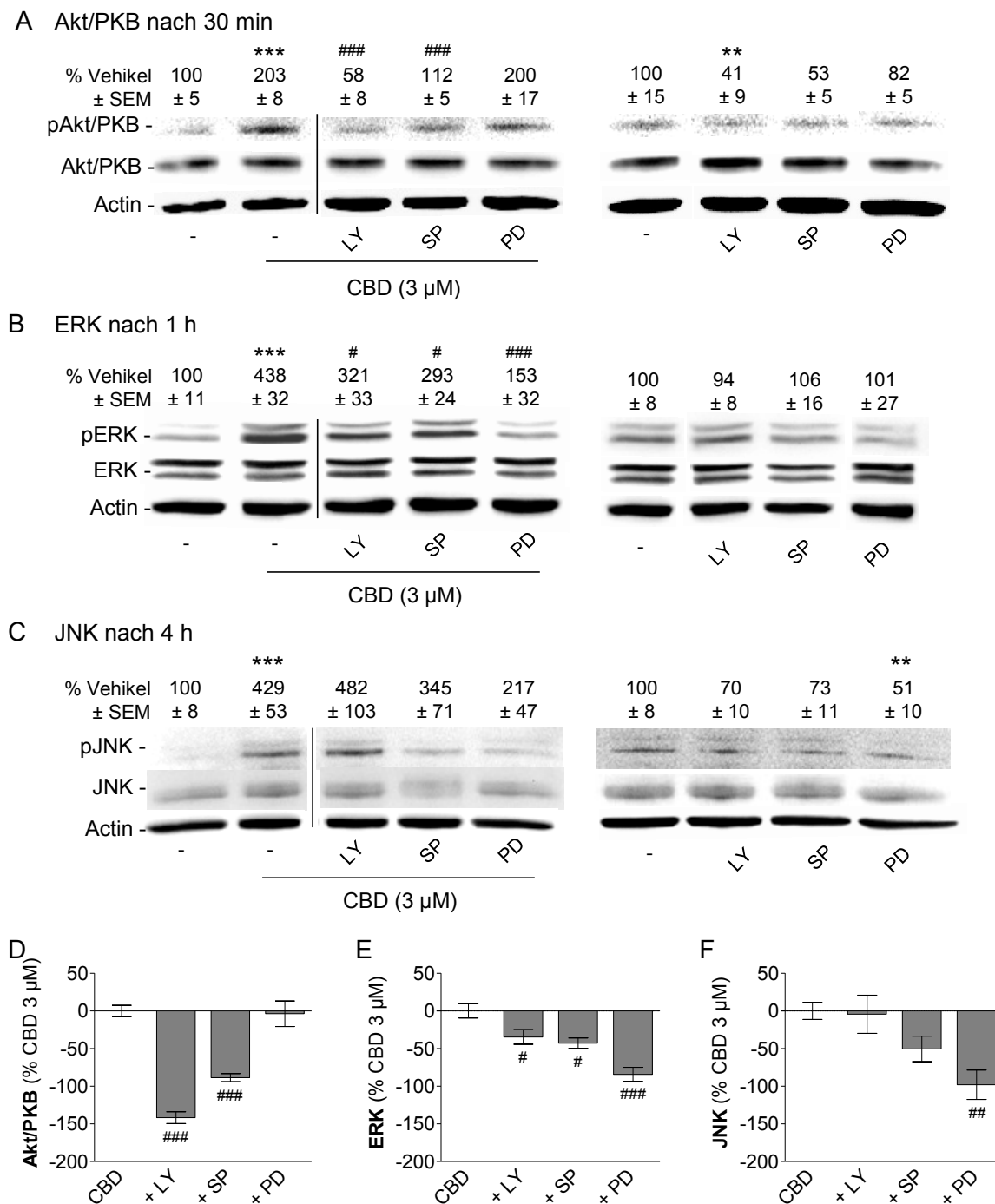


Abbildung 22: Partielle Aktivierung von ERK durch die PI3K und JNK

Einfluss von LY294002 (LY, PI3K-Inhibitor), SP600125 (SP, JNK-Inhibitor) und PD98059 (PD, MAPK/ERK-Kinase Inhibitor) auf die CBD-induzierte Aktivierung der Akt/PKB (Proteinkinase B, Hauptaktivierungsprodukt der PI3K) nach 30 min (**A**), der ERK nach 1 h (**B**) und der c-Jun N-terminale Kinase p46 (JNK) nach 4 h (**C**). Western-Blot-Analysen der jeweils phosphorylierten (p-Akt/PKB, p-ERK, pJNK) und nicht-phosphorylierten (Akt/PKB, ERK, JNK) Form der Kinasen aus Zelllysaten von ASC. Nach 1 h Präinkubation mit 5 µM LY oder SP bzw. 1 µM PD wurden die ASC mit 3 µM CBD oder Vehikel stimuliert und nach 0,5, 1 und 4 h lysiert. **D-F**, Quantitative Darstellung der Inhibition des CBD-Effektes durch LY (**D**), SP (**E**) und PD (**F**).

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 12 (**A**, links & **D**, 4 Spender, außer Analyse von SP [n = 6, 2 Spender] und PD [n = 8, 3 Spender]), n = 6 (**A**, rechts, 2 Spender, außer Analyse von SP, PD [n = 3, 1 Spender]), n = 6 (**B** & **E**, 2 Spender, außer Analyse von SP +/- CBD, LY - CBD [n = 3, 1 Spender]), n = 13 (**C** & **F**, 4 Spender, außer Analyse von LY & SP +/- CBD, PD + CBD [n = 10, 3 Spender], PD - CBD [n = 6, 2 Spender]) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. Werte sind Mittelwerte ± SEM; ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (linke Panel) oder Dunnet's Post-hoc-Test (rechte Panel; **D-F**); *** $P \leq 0.001$ vs. Vehikel; # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. CBD-behandelte Zellen.

Da die CBD-induzierte ERK-Aktivierung über CB₂ und GPR55 vermittelt wurde, sollte nun überprüft werden, ob diese Rezeptoren auch an der Akt/PKB- und JNK-Aktivierung beteiligt sind. Dafür wurden ASC 1 h mit je 1 µM AM-251, AM-630, Capsazepin und O-1602 präinkubiert und anschließend mit 3 µM CBD oder Vehikel stimuliert. Nach 0,5 h wurde die Akt/PKB- und nach 4 h die JNK-Aktivierung mittels *Western Blot* der Zelllysate analysiert.

Weder die Expression von Akt/PKB noch die von JNK wurde durch einen der eingesetzten Rezeptorantagonisten bzw. -agonisten signifikant gehemmt (siehe Abbildung 23 A-D). Durch die Hemmung des TRPV1 wurde die Expression im Vergleich zur CBD-induzierten Proteinexpression signifikant verstärkt (siehe Abbildung 23 A+C). Es ist bei Akt/PKB jedoch eine Tendenz zur Beteiligung des CB₂ und GPR55 erkennbar (siehe Abbildung 23 A+B). Die CBD-induzierte Phosphorylierung wurde bei Inhibierung des CB₂ bzw. Aktivierung des GPR55 um ca. 41 % bzw. 25 % gehemmt.

Bei Testung der Rezeptorantagonisten und -agonisten auf die basalen Aktivierungen der Akt/PKB und JNK (siehe Abbildung 23 E, F) wurde bei JNK eine signifikante Hemmung der basalen Proteinexpression bei Aktivierung des GPR55 festgestellt.

4.1.6 Zusammenfassung der CBD-Effekte auf die Migration

Das Phytocannabinoid CBD steigerte die Migration der ASC. Dieser Effekt wurde durch die Hemmung der MAPK ERK fast vollständig aufgehoben und durch Hemmung des CB₂ und Aktivierung des GPR55 inhibiert. Dieselben Rezeptoren waren auch in die Aktivierung der ERK involviert. Darüberhinaus konnten die CBD-Effekte auf Migration und ERK-Aktivierung mit dem CB₂-Agonisten JWH-133 und dem GPR55-Antagonisten O-1918 reproduziert werden.

Bei der Analyse weiterer potentiell beteiligter Kinasen an dem promigrativen Effekt von CBD zeigte sich eine Involvierung der PI3K und JNK, aber nicht der p38 und FAK. Western-Blot-Analysen ließen eine frühe Aktivierung von Akt/PKB und eine kontinuierlich und parallel ansteigende ERK- und JNK-Aktivierung erkennen. Ferner wurde eine partielle Hemmung der ERK bei Inhibierung der PI3K und JNK festgestellt. Die Aktivierungen beider Kinasen wurden cannabinoidrezeptorunabhängig vermittelt, wobei die Akt/PKB-Aktivierung tendenziell via CB₂ und GPR55 erfolgte.

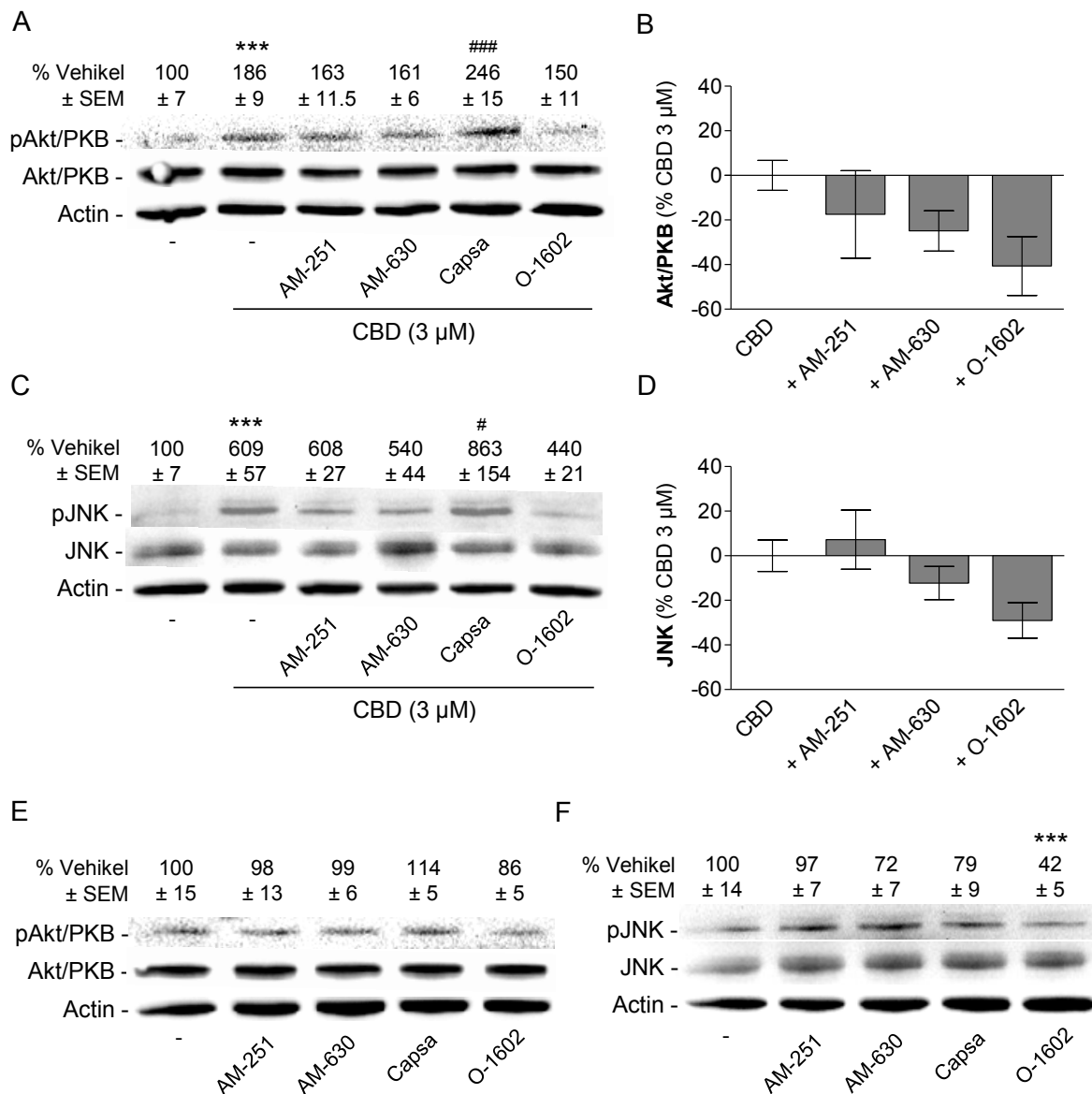


Abbildung 23: PI3K und JNK vermitteln ihre Effekte receptorunabhängig

A-D, Involvement of the Cannabinoid receptors 1 and 2, of TRPV1 and of GPR55 in the CBD-induced activation of the Akt/PKB after 0,5 h and of the p46-JNK (JNK) after 4 h. **B,D**, quantitative representation of the inhibition of the CBD-effect by the respective antagonists or agonists. **E, F**, Own effects of the receptor antagonists and -agonists on the Akt/PKB- or p46-JNK-activation on the protein level. After 1 h preincubation with 1 µM AM-251 (CB₁-Antagonist), AM-630 (CB₂-Antagonist), Capsazepin (Capsa, TRPV1-Antagonist) or O-1602 (GPR55-Agonist) the ASC were stimulated with 3 µM CBD (A-D) or vehicle (A-F) and by means of *Western Blot* the phosphorylated (pAkt/PKB, pJNK) and non-phosphorylated (Akt/PKB, JNK) form of the kinases from cell lysates of ASC were analyzed.

Shown are mean values ± SEM of n = 9 (A - D, 3 Spender, except analysis of Capsa [n = 6, 2 Spender]), n = 6 (E, F, 2 Spender) experiments. The displayed protein bands show a representative *Blot*. ANOVA with Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (A, C) or Dunnett's *Post-hoc-Test* (B, D-F); *** $P \leq 0.001$ vs. Vehicle; # $P \leq 0,05$, ### $P \leq 0,001$ vs. CBD-treated cells.

4.1.7 Das Phytocannabinoid THC wirkt ebenfalls promigrativ auf ASC

In Schlüsselexperimenten wurde als weiteres Phytocannabinoid THC auf eine potenziell promigrative Wirkung untersucht.

Alle Versuche wurden analog zu den CBD-Experimenten durchgeführt. Die Stimulation der ASC erfolgte mit 3 μ M THC oder Vehikel. Für die Versuche mit Rezeptorantagonisten bzw. –agonisten wurden die ASC zusätzlich 1 h mit je 1 μ M AM-251 (Antagonist am CB₁), AM-630 (Antagonist am CB₂), Capsazepin (Antagonist am TRPV1) und O-1602 (Agonist am GPR55) präinkubiert. Die Migration wurde nach 6 h Inkubationszeit mittels *Boyden Chamber Assay* analysiert. Für die Analyse der ERK-Aktivierung via *Western Blot* wurden die ASC nach 3 h Serumentzug stimuliert, und bis zu 6 h inkubiert. Nach 0,25, 0,5, 1, 2 und 6 h wurden die Zellen lysiert und Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten durchgeführt.

In Übereinstimmung mit dem zuvor gezeigten CBD-Effekt auf die Migration von ASC konnte auch für THC eine promigrative Wirkung (siehe Abbildung 24 A), die unabhängig von einer Modulation der Viabilität verläuft, nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 24 B zu sehen führte THC zu einer signifikanten Steigerung der Viabilität, welche aber lediglich 9 % betrug.

Die THC-induzierte Migration wurde bei Antagonisierung des CB₁, CB₂ und TRPV1 inhibiert (siehe Abbildung 24 C). Im Gegensatz zu den Versuchen mit CBD bewirkt eine Aktivierung des GPR55 keine Hemmung der promigrativen Wirkung von THC.

Des Weiteren wurde eine THC-induzierte Migration vollständig durch den MEK-Inhibitor PD98059 aufgehoben (siehe Abbildung 24 D), wodurch die grundlegende Rolle der ERK bei der cannabinoidvermittelten Migration bestätigt wurde.

In weiteren Versuchen wurde der Zeitverlauf der ERK-Proteinexpression nach Stimulation mit THC (siehe Abbildung 25 A; Seite 73) analysiert und als Zeitpunkt für weitere ERK-Analysen 1 h gewählt.

Der MEK/ERK-Inhibitor PD98059 führte zu einer partiellen Hemmung der THC-induzierten ERK-Aktivierung (siehe Abbildung 25 B), was Raum für die Beteiligung anderer Kinasen an der Aktivierung der ERK lässt. In Übereinstimmung mit den Migrationsergebnissen inhibierten AM-251 (CB₁) und AM-630 (CB₂) die ERK-Aktivierung durch THC (siehe Abbildung 25 C, D). Eine Antagonisierung des TRPV1 und eine weitere Aktivierung des GPR55 durch O-1602 hatten keinen Hemmeffekt.

Demzufolge fördert auch das psychoaktive Cannabinoid THC die Migration von humanen ASC. Letztere wurde über die Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 und eine Aktivierung der ERK vermittelt.

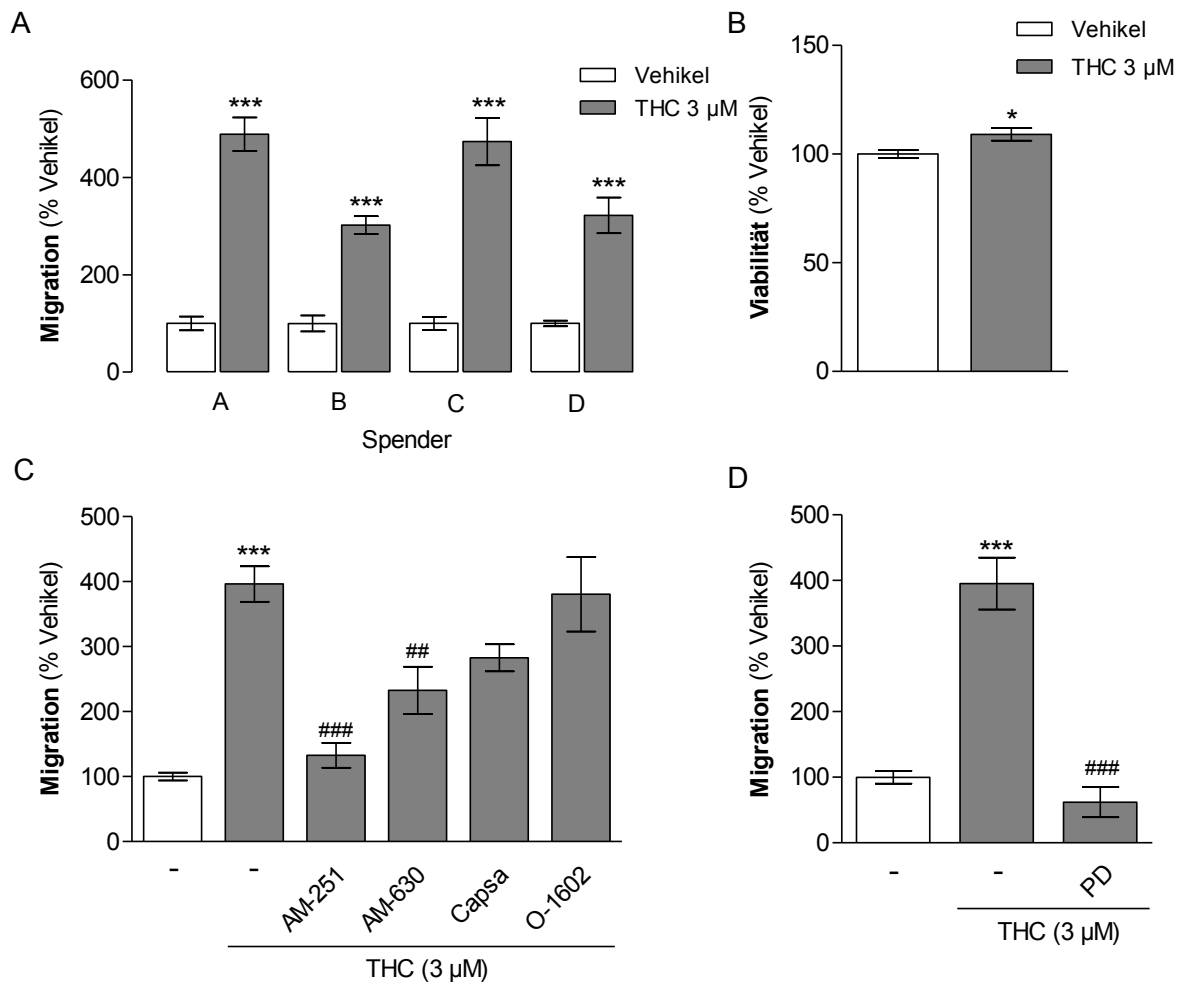


Abbildung 24: Promigrativer Effekt des Cannabinoids Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) auf ASC.

A, Variabilität des promigrativen Effektes von THC zwischen mehreren Stammzellspendern. **B**, Viabilität der ASC nach 6 h Inkubation mit THC oder Vehikel, WST-1-Proliferationstest. **C**, Involvement des CB₁ (Antagonist: AM-251) und CB₂ (Antagonist: AM-630), des TRPV1 (Antagonist: Capsazepin, Capsa) und des GPR55 (Agonist: O-1602) in die THC-induzierte Migration. **D**, Einfluss des MAPK/ERK Kinase-Hemmers PD98059 (PD) auf den THC-induzierten promigrativen Effekt. **A**, **C**, **D**, nach 1 h Präinkubation mit 1 μ M der jeweiligen Inhibitoren, Antagonisten und O-1602, Stimulation mit 3 μ M THC oder Vehikel und Quantifizierung der Migration nach 6 h mittels *Boyden Chamber Assay*.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n = 4 (A, pro Spender, B, 1 Spender), n = 16 (C, 4 Spender), n = 8, (D, 2 Spender). Student's t-Test (A, B) oder ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (C, D); * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ vs. THC-behandelte Zellen.

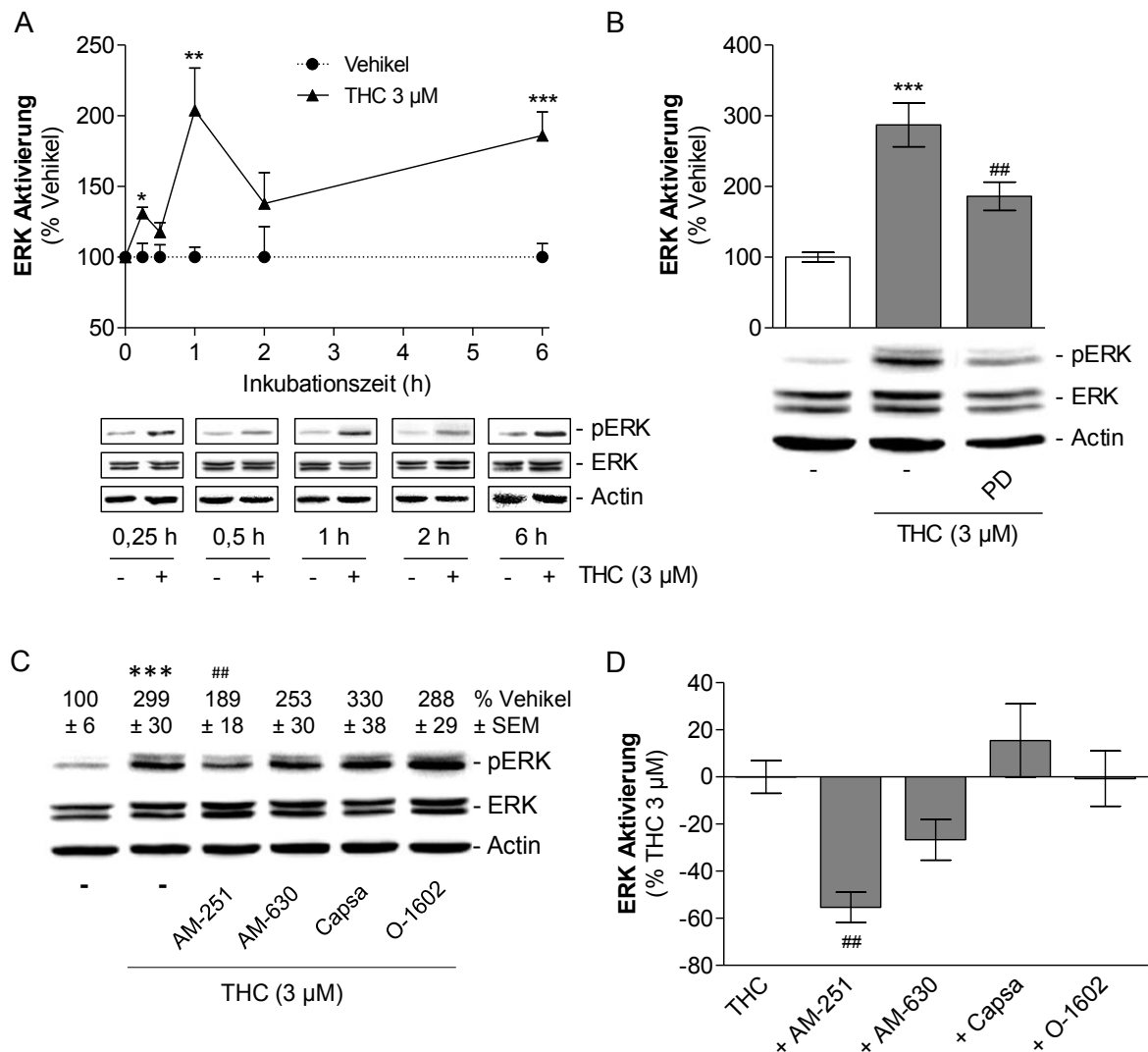


Abbildung 25: ERK-Aktivierung durch THC in ASC.

A, Zeitverlauf der ERK-Aktivierung durch THC auf Proteinebene. Western-Blot-Analysen der phosphorylierten (pERK) und nicht-phosphorylierten ERK aus Zelllysaten von ASC, welche bis zu 6 h mit THC oder Vehikel inkubiert wurden. **B**, Einfluss des MAPK/ERK Kinase-Hemmers PD98059 (PD) auf die THC-induzierte ERK-Aktivierung. **C**, **D**, Involvement der Cannabinoidrezeptoren 1 (Antagonist: AM-251) und 2 (Antagonist: AM-630), des TRPV1 (Antagonist: Capsazepin, Capsa) und des GPR55 (Agonist: O-1602) in die THC-induzierte Aktivierung der ERK. **D**, Quantitative Darstellung der Inhibition des THC-Effektes auf die ERK-Aktivierung durch die jeweiligen Antagonisten bzw. Agonisten. **B-D**, nach 1 h Präinkubation mit je 1 μ M des jeweiligen Inhibitor, Antagonisten bzw. Agonisten wurden die ASC mit Vehikel oder THC stimuliert und nach 1 h die ERK-Aktivierung auf Proteinebene via *Western Blot* analysiert.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ (A, 2 Spender, außer 0,25-h- und 0,5-h-Inkubation [$n = 3$, 1 Spender]), $n = 14$ (B, 4 Spender), $n = 17$ (C, D, 5 Spender) Experimenten. Die abgebildeten Proteinbanden zeigen jeweils einen repräsentativen *Blot*. Student's t-Test (A) oder ANOVA mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test* (B, C) bzw. Dunnet's Post-hoc-Test (D); * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel; ## $P \leq 0,01$ vs. THC-behandelte Zellen.

4.2 Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch Cannabinoide

4.2.1 Verwendung serumreduzierter Kulturbedingungen

Um mögliche Serum-vermittelte Effekte oder Effekt-Maskierungen durch Eiweißbindung der eingesetzten Cannabinoide zu verhindern, wurden ASC vergleichend mit 1, 5 und 10 % FKS in unstimulierendem Kontrollmedium (US) und osteogenem Differenzierungsmedium (OS) kultiviert.

Die ASC konnten auch unter serumreduzierten Bedingungen über einen Zeitraum von 35 Tagen kultiviert und osteogen differenziert werden. Dabei wurde mit steigendem FKS-Gehalt eine Zunahme der Differenzierungseffizienz (siehe Abbildung 26; Abbildung 27, Seite 75) und der Zellzahl (siehe Abbildung 27 A) nachgewiesen.

Da eine möglichst niedrige FKS-Konzentration angestrebt war, wurde bei den folgenden Stimulationen der ASC mit Cannabinoiden mit 1 % FKS-Gehalt im Medium gearbeitet.

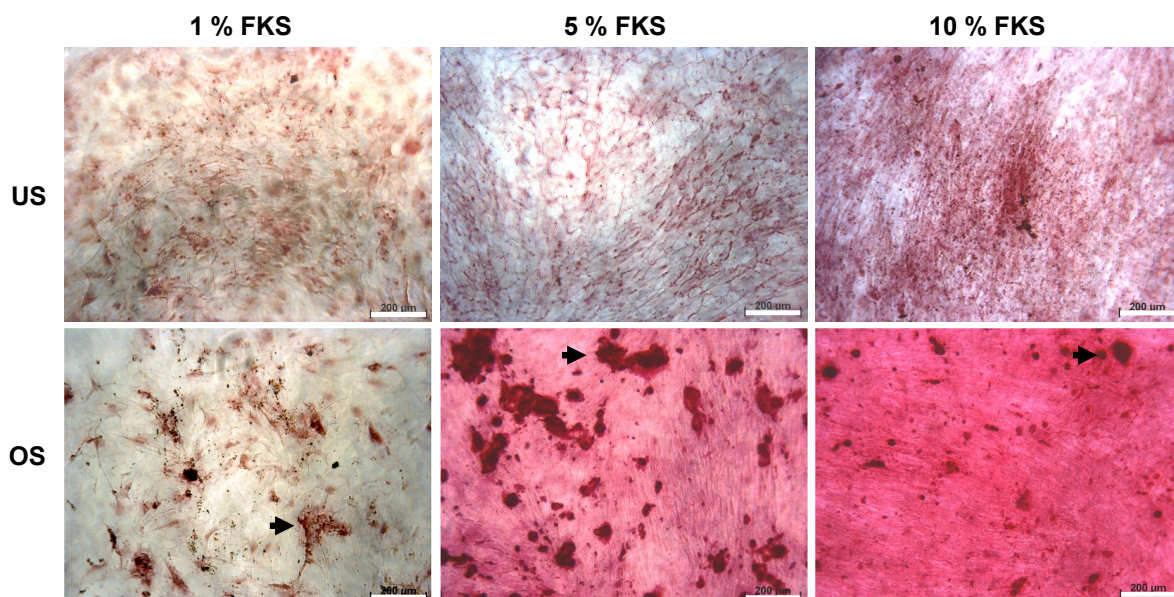


Abbildung 26: Zunahme des Kalziumgehalts in der extrazellulären Matrix mit ansteigendem FKS-Gehalt

Hellfeldaufnahmen von ASC, die für 35 Tage mit 1, 5 oder 10 % FKS in unstimulierendem (US) oder osteogen stimulierendem Medium (OS) inkubiert wurden. Die schwarzen Pfeile markieren kalziumreiche Ablagerungen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

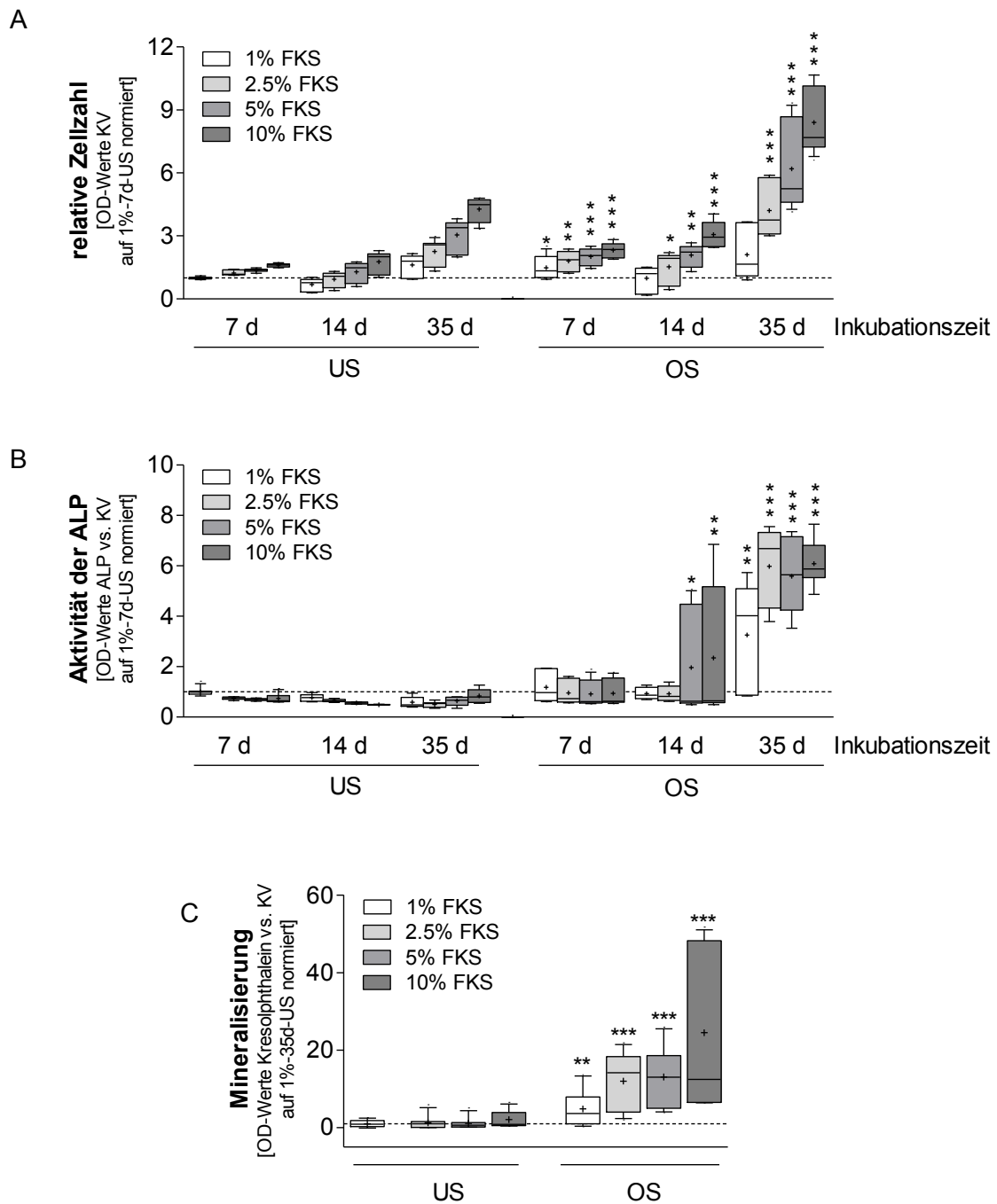


Abbildung 27: Einfluss der FKS-Konzentration auf Zellzahl und osteogene Differenzierung von ASC *in vitro*

ASC wurden bis zu 35 d in osteogenem Differenzierungsmedium (OS) oder unstimulierendem Kontrollmedium (US) mit verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Nach 7, 14 und 35 d wurde die Zellzahl mittels Kristallviolett-Färbung (A; KV) und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase mittels Hydrolyse von para-Nitrophenylphosphat (B; ALP) quantifiziert. Die Mineralisierung der extrazellulären Matrix wurde nach 35 d Inkubation quantitativ mittels Kresolphthalein-Komplexierung der Kalzium-Ionen (C) ermittelt. Die Werte der optischen Dichten (ODs) von ALP und Kresolphthalein wurden auf die OD-Werte der Kristallviolett-Färbung normalisiert.

Abgebildet sind die Mediane \pm 10/90 % Whisker von $n = 12$ (A, C, 2 Spender), $n = 8$ (B, 2 Spender) Experimenten. Mann Whitney Test; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. US der jeweiligen FKS-Konzentration. Das + markiert den arithmetischen Mittelwert.

4.2.2 CBD hemmt die Proliferation von ASC

Zur Untersuchung der Proliferation der ASC nach Stimulation mit Vehikel oder 3 μ M CBD wurde die relative Zellzahl in Kristallviolett-Färbungen ermittelt. Die Analysen erfolgten alle 1-2 Wochen über einen Zeitraum von 4-5 Wochen. Die Zellzahl nahm bei Stimulation mit Vehikel und CBD zu (siehe Abbildung 28 A). Sie stieg auf das 1,6-fache bei Vehikel- und auf das 1,3-fache bei CBD-Stimulation. Dabei war ab 2 Wochen Inkubationsdauer die Zellzahl bei Stimulation mit CBD signifikant niedriger als bei Stimulation mit dem Vehikel (siehe Abbildung 28 A+B). Nach 5 Wochen lag die relative Zellzahl CBD-stimulierter ASC 24 % unter der Zellzahl der Vehikel-stimulierten Zellen.

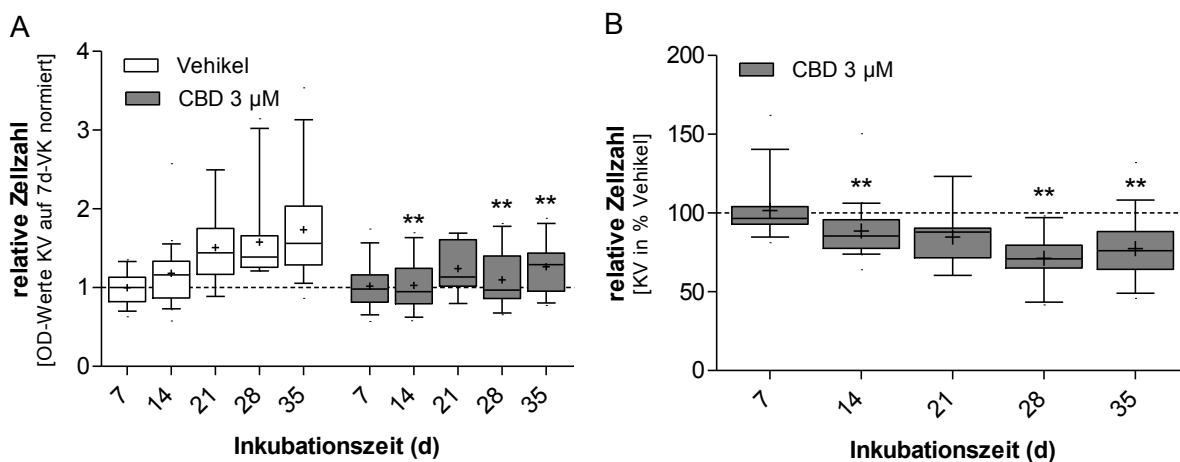


Abbildung 28: CBD hemmt die Proliferation von ASC

Entwicklung der relativen Zellzahl über eine Inkubationszeit von 35 d: optische Dichten (ODs) bezogen auf den Wert des Vehikels nach 7 d (A) und Prozentangaben bei Stimulation mit CBD im Bezug zum jeweiligen Vehikel (B). ASC wurden mit 3 μ M CBD oder Vehikel (VK) stimuliert und nach 7, 14, 21, 28 und 35 d wurde die relative Zellzahl mittels Kristallviolett-Färbung (KV) bestimmt.

Abgebildet sind die Mediane \pm 10/90 % Whisker von 13 (7 d), 21 (14 d), 9 (21 d), 10 (28 d) und 16 Spendern (35 d), wobei jeweils nur der Median des Quadruplikates einbezogen wurde. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben; ** $P \leq 0,01$ vs. Vehikel (A) bzw. 100 (B). Das + markiert den arithmetischen Mittelwert.

4.2.3 CBD fördert die metabolische Zellaktivität von ASC

Um den Einfluss von CBD auf die metabolische Zellaktivität zu untersuchen, wurden ASC bis zu 35 Tage mit Vehikel oder 3 μ M CBD stimuliert und alle 1-2 Wochen parallel zur Kristallviolett-Färbung ein MTS-Test durchgeführt. Die metabolische Zellaktivität schwankte bei den Vehikel-behandelten ASC um den Ausgangswert und stieg bei CBD-behandelten Zellen auf das 1,3-fache nach 35 Tagen an (siehe Abbildung 29 A). Im direkten Bezug auf das Vehikel nach 35 Tagen entspricht dies einer Steigerung der metabolischen Zellaktivität auf 129 % (siehe Abbildung 29 B).

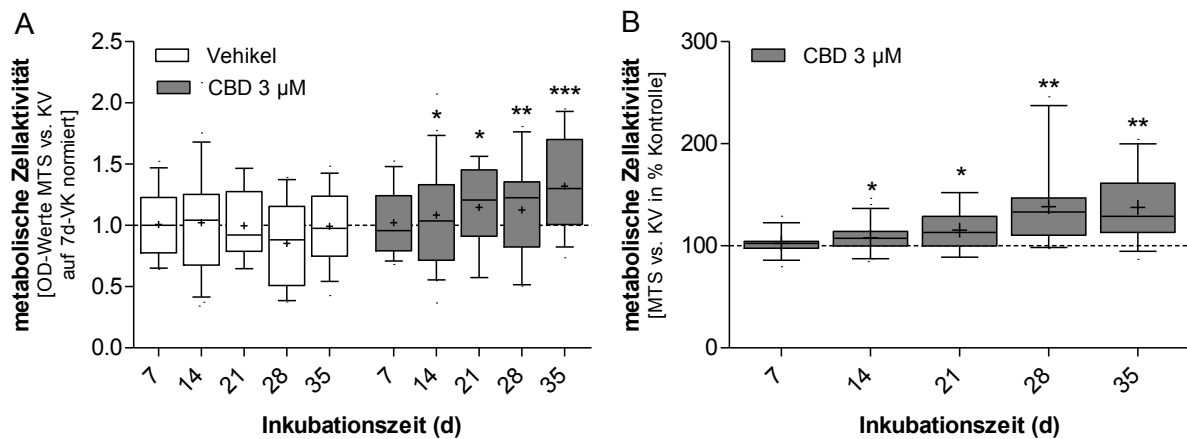


Abbildung 29: CBD fördert die metabolische Zellaktivität

Die Entwicklung der metabolischen Zellaktivität nach bis zu 35 d Stimulation mit 3 µM CBD oder Vehikel. **A**, Zellaktivität bezogen auf den Wert des Vehikels nach 7 d. **B**, Prozentangaben bei CBD-Behandlung im Bezug zum jeweiligen Vehikel. Die optischen Dichten (ODs) aus dem MTS-Test (MTS) wurden auf die optischen Dichten der Kristallviolett-Färbung (KV) normalisiert.

Dargestellt sind die Mediane \pm 10/90 % Whisker von 13 (7 d), 21 (14 d), 9 (21 d), 10 (28 d) und 16 Spendern (35 d), wobei nur die Mediane der Quadruplikate einbezogen wurden. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel (A) bzw. 100 (B). Das + markiert den arithmetischen Mittelwert.

4.2.4 CBD fördert die osteogene Differenzierung von ASC

Zur Untersuchung der osteogenen Differenzierung wurde parallel zur relativen Zellzahl und metabolischen Zellaktivität die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) mittels ALP-Assay quantifiziert. Zum Endpunkt des Versuches nach 4-5 Wochen erfolgte dann die Quantifizierung der Mineralisierung durch Bestimmung des Kalziumgehaltes der ECM via Kresolphthalein-Komplexierung der enthaltenen Kalziumionen.

Die Aktivität der ALP lag die gesamten 5 Wochen unter dem Ausgangswert des Vehikels am 7. Tag (siehe Abbildung 30 A). Die Werte der CBD-stimulierten ASC stiegen nach 28 Tagen über die der Vehikel-stimulierten Zellen (siehe Abbildung 30 B) auf 114 % und nach 35 Tagen auf 143 % der Vehikelkontrolle.

Vor der Auswertung der Mineralisierungsversuche wurde überprüft, ob alle gemessenen Extinktionen der Kresolphthalein-Komplexierung (Vehikel und CBD) über dem Wert X_{\min} lagen (siehe 2.6.1, Seite 44). Infolgedessen wurden 4 der 27 untersuchten Spender nicht in die Auswertung einbezogen. Wie in Abbildung 30 C zu erkennen, stieg die Mineralsierung von 4 auf 5 Wochen an, wobei die Kresolphthalein-Werte bei Stimulation mit CBD zu beiden Zeitpunkten über denen der Vehikel-behandelten ASC lagen (siehe Abbildung 30 D). Nach 35 Tagen lag der Mineralisierungswert CBD-behandelter Zellen bei 145 % der Vehikelkontrolle.

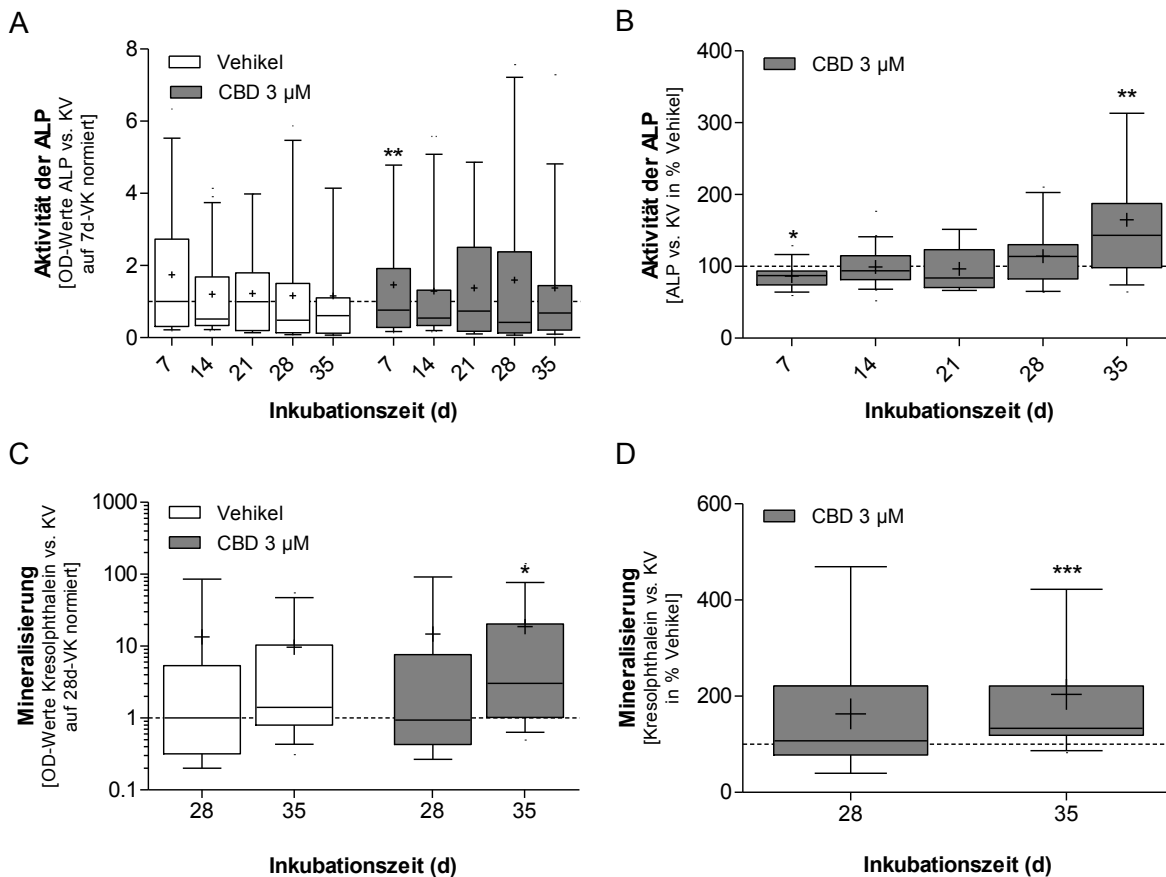


Abbildung 30: CBD fördert die osteogene Differenzierung *in vitro*

A, B, Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) nach 7, 14, 21, 28 und 35 d: optische Dichten (ODs) normiert auf den Wert des Vehikels nach 7 d (A); prozentuale Induktion der ALP-Aktivität in CBD-behandelten ASC in Bezug zum Vehikel (B). **C, D**, Quantifizierung der Mineralisierung nach 28 und 35 d: ODs normiert auf den Wert des Vehikels nach 28 d (C); prozentuale Steigerung der Mineralisierung im Bezug zum jeweiligen Vehikel (D). Die optischen Dichten von ALP und Kresolphthalein wurden auf die jeweilige Zellzahl (Kristallviolett-Färbung, KV) normalisiert.

Dargestellt sind die Mediane \pm 10/90 % Whisker von: A, B: 13 (7 d), 21 (14 d), 9 (21 d), 10 (28 d), 16 Spendern (35 d); C, D: 7 (28 d) und 17 Spendern (35 d). Dabei wurde nur der Median der Tri- oder Quadruplikate einbezogen. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben (A-D); * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. Vehikel (A, C) bzw. 100 (B, D). Das + markiert den arithmetischen Mittelwert.

4.2.5 CBD-Effekte sind konzentrationsabhängig

Für die Überprüfung einer Konzentrationsabhängigkeit der CBD-Effekte wurden die folgenden CBD-Konzentrationen getestet: 0,1, 1 und 3 µM. Dabei erfolgte die Analyse der relativen Zellzahl, metabolischen Zellaktivität und osteogenen Differenzierung nach 14 und 35 Tagen. Es konnte bei der Zellzahl und der Zellaktivität eine eindeutige Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden (siehe Abbildung 31 A, B). Bei den Differenzierungsanalysen (Aktivität der ALP und Kresolphthalein-Komplexierung) war dieser Effekt schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 31 C, D).

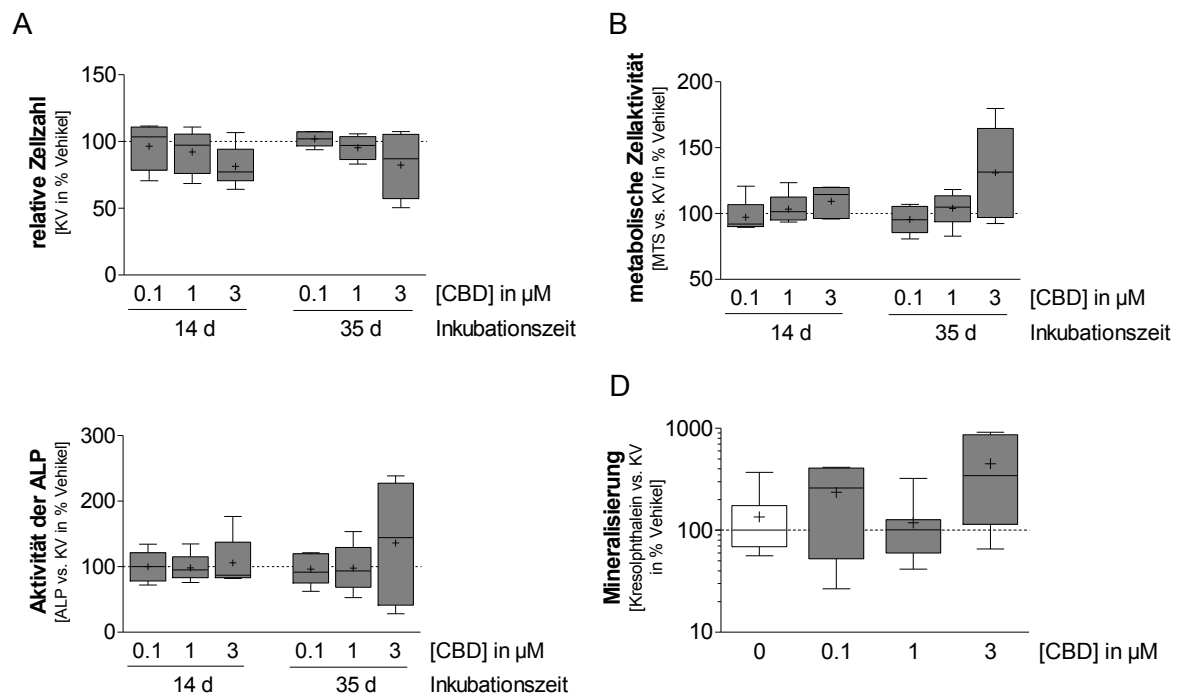


Abbildung 31: CBD hat eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Zellzahl, metabolische Zellaktivität und osteogene Differenzierung

Quantifizierungen der relativen Zellzahl (**A**), der metabolischen Zellaktivität (**B**), der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP; **C**) und der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (**D**) nach 14 d (A-C) und 35 d (A-D). Prozentuale Änderung des jeweiligen Parameters in Bezug zur Kontrolle. Ermittlung der jeweiligen Werte via Kristallviolett-Färbung (KV), MTS-Test (MTS), Hydrolyse von *para*-Nitrophenylphosphat (ALP) bzw. Kresolphthalein-Komplexierung der Kalziumionen in der ECM. Die optischen Dichten (ODs) von MTS, ALP und Kresolphthalein wurden auf die ODs der Zellzahl normalisiert.

Dargestellt sind die Mediane \pm 10/90 % Whisker von 5 (A-C) und 2 Spendern (D), welche als Quadruplikate ermittelt wurden. Bei A-C wurde nur der Median der Einzelerperimente einbezogen. Das + markiert den arithmetischen Mittelwert.

4.2.6 Regulation osteogen-assoziiierter Gene durch CBD

Zur Untersuchung der Regulation osteogen-assoziiierter Gene nach Stimulation mit CBD wurde die RNA von ASC von drei Spendern, welche denselben experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren, gepoolt und mittels TaqMan® *Arrays Human Osteogenesis* analysiert. Dabei erfolgte die Stimulation in 3 Gruppen (Vehikelkontrolle, 3 µM CBD und osteogene Stimulation [OS]), und die Ernte der RNA zu zwei Zeitpunkten (3 und 14 Tage). Als angegebener Bezugswert der Regulationen diente die Vehikelkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. Ferner wurde als weitere Referenz die RNA der Spender vor der 1. Stimulation (Tag 0) isoliert.

Wie in Tabelle 13 auszugsweise zusammengefasst, wurden neben der ALP auch andere, für die osteogene Differenzierung beschriebene Gene durch CBD hochreguliert: Arylsulfatase E (involviert in den Aufbau der Knochen- und Knorpelmatrix), Mitglieder der knochenmorphogenetischen Proteinfamilie (*bone morphogenetic proteins*) BMP2, BMP4 und BMP7, verschiedene Kollagene (COL4A5, COL9A2), die koloniestimulierenden Faktoren

CSF2 und CSF3, die msh homeobox 1 und 2 (MSX1, MSX2), *vascular endothelial growth factor* B und C (VEGFB, VEGFC). Interessanterweise wurde von CBD das Enamelin (ENAM) im Verhältnis zum Vehikel am stärksten induziert: mit einem 8,1-fachen Anstieg (OS: 8,6-fache) nach 14 Tagen.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse des Osteogenese-Arrays befindet sich im Anhang in Tabelle 15. Sie beinhaltet neben der n-fachen Induktion zur jeweiligen Vehikelkontrolle, die mRNA-Induktion bezogen auf den Tag 0 (vor der ersten Stimulation).

Tabelle 13: Regulation ausgewählter Gene des TaqMan® Arrays „Human Osteogenesis“

osteogener Parameter		n-fache mRNA Induktion			
Gen	Abkürzung	3 Tage		14 Tage	
		CBD 3 µM	OS	CBD 3 µM	OS
alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	ALPL	1,1	1,2	2,3	2,5
arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)	ARSE	0,9	1,5	1,5	2,2
bone morphogenetic protein 2	BMP2	0,8	2,8	2,9	1,9
bone morphogenetic protein 4	BMP4	1,0	3,6	2,1	0,4
bone morphogenetic protein 7	BMP7	2,3	0,8	4,7	2,8
collagen, type IV, alpha 5	COL4A5	1,4	0,9	1,4	1,7
collagen, type IX, alpha 2	COL9A2	1,8	2,3	2,1	0,6
colony stimulating factor 2	CSF2	1,9	0,9	4,0	1,3
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	CSF3	1,2	2,2	1,4	2,7
enamelin	ENAM	n.d.	n.d.	8,1	8,6
msh homeobox 1	MSX1	1,2	2,2	2,2	2,3
msh homeobox 2	MSX2	1,2	1,5	1,5	1,5
vascular endothelial growth factor B	VEGFB	1,8	1,8	1,4	0,3
vascular endothelial growth factor C	VEGFC	1,1	1,5	1,1	0,5

4.2.7 Zusammenfassung der CBD-Effekte auf die osteogene Differenzierung

Es wurde gezeigt, dass ASC auch unter Niedrigserum-Bedingungen osteogen differenzierbar sind. CBD steigerte in den Langzeit-Differenzierungsversuchen die Aktivität der ALP und erhöhte den Mineralisierungsgrad der ECM. Diese Effekte waren von einer Hemmung der Proliferationsrate und Steigerung der metabolischen Zellaktivität begleitet. Alle untersuchten Langzeiteffekte von CBD waren dabei konzentrationsabhängig. Darüber hinaus steigerte CBD die Expression mehrerer in die osteogene Differenzierung involvierter Gene, wie ALPL, BMP2, BMP4 und verschiedene Kollagene.

5 Diskussion

Neuere Studien legen nahe, dass Cannabinoide Wundheilungsprozesse durch Steigerung der Migration regenerativer Zellen fördern. In diesem Zusammenhang wird auch die Wirkung von Cannabinoiden auf das *bone remodeling* untersucht. Hierbei ist jedoch kaum geklärt, wie MSC den durch Cannabinoide geförderten Knochenumbau unterstützen. Ebenso ist der zugrundeliegende Mechanismus der cannabinoidinduzierten Stammzellmigration wenig bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals eine Induktion der Migration und osteogenen Differenzierung von ASC durch das nicht psychoaktive Cannabinoid CBD.

5.1 Migration

5.1.1 Promigrative Wirkung von CBD

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits bei einer Konzentration von 0,01 μM eine promigrative Wirkung von CBD auf ASC nachgewiesen. In einer Humanstudie mit Patienten, denen oral 10 mg/kg/Tag CBD verabreicht wurde, lag die durchschnittliche Plasmakonzentration von CBD nach 6 Wochen Behandlung bei 0,036 μM (\pm 11,2 ng/ml) [Consroe *et al.*, 1991]. Demnach übte CBD schon in pharmakotherapeutisch relevanten Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Migration von MSC aus. Ferner konnte auch im *Scratch*-Assay eine promigrative Wirkung von CBD gezeigt werden, was zu dem Schluss führt, dass der Effekt von CBD auf ASC nicht nur durch Chemotaxis, sondern auch durch Chemokinese zustande kommt.

Bezüglich des zugrundeliegenden Mechanismus der promigrativen Wirkung von CBD führt eine vorgeschaltete Aktivierung des CB₂, eine Inhibierung des GPR55 sowie eine anschließende ERK-Aktivierung zu einer Induktion der Migration von ASC. Als mögliche Upstream-Mediatoren der ERK-Aktivierung konnten PI3K/Akt und JNK bestimmt werden. Dieser Mechanismus wird durch mehrere Ergebnisse unterstützt. **(I)**, die ERK wurde bereits vor der Induktion der Migration signifikant aktiviert. **(II)**, der MEK-Inhibitor PD98059 bewirkte eine fast vollständige Hemmung der CBD-induzierten Migration. **(III)**, Antagonisierung des CB₂ und die Aktivierung des GPR55 führten zu einer Inhibierung des CBD-Effektes auf Migration und ERK-Aktivierung. **(IV)**, die grundlegende Rolle des GPR55 in der Migration von MSC konnte mit dem GPR55-Antagonisten O-1918 bestätigt werden. Dieser führte zu einer konzentrationsabhängigen Migration und ERK-Aktivierung, die durch den GPR55-Agonisten O-1602 gehemmt wurden. **(V)**, der CB₂-Agonist JWH-133 hatte ebenfalls eine promigrative und ERK-aktivierende Wirkung, die durch den CB₂-Antagonisten AM-630 inhibiert wurde. **(VI)**, PI3K/Akt und JNK hatten einen zeitlichen Aktivierungsspeak vor ERK. **(VII)**, eine Inhibierung beider Kinasen resultierte in einer partiellen Hemmung der CBD-induzierten

ERK-Aktivierung, wobei eine MEK/ERK-Inhibierung keine spezifische Hemmung der Aktivierung von Akt/PKB und JNK durch CBD bewirkte.

Diese Erkenntnisse stimmen mit anderen Studien, die eine positive Wirkung von Cannabinoiden auf die Migration regenerativer Zellen nachgewiesen haben, überein. So zeigte das endocannabinoidähnliche Lipid *N-Arachidonoyl serine* (AraS) eine promigrative Wirkung auf *human dermal microvascular endothelial cells* (HMVEC), welche von einer Aktivierung der ERK, PI3K und VEGF C begleitet wurde [Zhang *et al.*, 2010]. Des Weiteren förderte das stabile AEA-Analogon R(+)-Methanandamid die Migration von endometrialen Stromazellen und aktivierte in diesem Zusammenhang PI3K/Akt und ERK [Gentilini *et al.*, 2010]. Bezüglich der Wirkung von Cannabinoiden auf die Migration undifferenzierter Zellen gibt es bisher wenige Daten. Eine Studie zeigte eine differenzierungsbedingte Hochregulierung von Cannabinoidrezeptoren sowie die CB₁- und CB₂-vermittelte Induktion der Chemotaxis durch 2-AG und THC in murinen embryonalen Stammzellen [Jiang *et al.*, 2007].

In Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit dokumentierte eine weitere Gruppe eine promigrative Wirkung von CBD auf primäre Ratten-Mikroglia [Martin-Moreno *et al.*, 2011]. Demgegenüber konnte eine hemmende Wirkung von CBD auf Glioblastomzellen [Vaccani *et al.*, 2005], humane Neutrophile [McHugh *et al.*, 2008] oder *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) [Solinas *et al.*, 2012] nachgewiesen werden. Diese gegensätzlichen Befunde legen nahe, dass die Modulation der Migration durch CBD ein zelltypabhängiges Ereignis darstellt.

5.1.2 Involvierung des CB₂ und GPR55

Im Zusammenhang mit der Beteiligung von Cannabinoidrezeptoren und Ionenkanälen an dem promigrativen Effekt von CBD wurde in dieser Arbeit der erste Nachweis für die Expression der Cannabinoidrezeptoren (CB₁, CB₂, GPR55) und des TRPV1 in ASC erbracht. Alle vier Rezeptoren wurden auf Proteinebene in Western-Blot-Analysen der Membranfraktion der ASC nachgewiesen. Weitere Studien wiesen die hier untersuchten Rezeptoren im Fettgewebe, auf Präadipozyten oder anderen Stammzelltypen nach. So wurde eine CB₁- und CB₂-Expression in humanen epikardialen Präadipozyten [Cappellano *et al.*, 2013], in MSC aus humanem Knochenmark [Rossi *et al.*, 2013] und in murinen neuronalen Stammzellen [Compagnucci *et al.*, 2013; Palazuelos *et al.*, 2006] gezeigt. Ferner wurde TRPV1 in humanem und murinem Fettgewebe sowie murinen Präadipozyten [Zhang *et al.*, 2007], und GPR55 auf humanen Adipozyten und in der SVF des Fettgewebes nachgewiesen [Moreno-Navarrete *et al.*, 2012].

In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen belegen auch andere Studien eine Beteiligung von Cannabinoidrezeptoren an der Wundheilung. Beispielsweise war während der Wundheilung in einem Rattenmodell die CB₁- und CB₂-Expression erhöht [Kozono *et al.*, 2010]. Ferner wurde aufgrund der zeitabhängigen Expression von CB₂ bei der Heilung von

Skelettmuskelverletzungen der Nachweis von CB₂-mRNA als forensischer Marker für Wundalter-Bestimmungen empfohlen [Yu *et al.*, 2010].

Dass CB₁ in der vorliegenden Arbeit nicht in die promigrative Wirkung von CBD involviert ist, könnte auf die generell geringe Interaktion von CBD mit den Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 zurückzuführen sein [Pertwee, 2008]. Vor diesem Hintergrund erscheint es auch eher überraschend, dass der CB₂ an dem CBD-Effekt auf Migration und MAPK-Aktivierung beteiligt ist. Allerdings zeigten die meisten Studien für CBD eine leicht höhere Affinität zum CB₂ als zum CB₁ [Pertwee, 2008] - es gibt sogar Befunde für eine 10fach höhere CBD-Affinität zum CB₂ (K_i-Wert: 2,4 µM) als zum CB₁ (K_i-Wert: 27,6 µM) [MacLennan *et al.*, 1998].

Bezüglich der CB₂-abhängigen CBD-induzierten Migration existieren Studien, die dieses Ergebnis unterstützten. So wurden die promigrative Wirkung von CBD auf primäre murine Mikroglia [Martin-Moreno *et al.*, 2011], vom CB₂-Agonisten HU308 auf die murine osteoblastähnliche Zelllinie MC3T3-E1 [Sophocleous *et al.*, 2011] und von 2-AG auf humane Knochenmark-Stammzellen [Rossi *et al.*, 2013], humane Monozyten [Kishimoto *et al.*, 2003] und Eosinophile [Oka *et al.*, 2004] via CB₂ vermittelt.

Die hier präsentierten Ergebnisse ließen keine Beteiligung von TRPV1 bei der CBD-induzierten Migration erkennen. Es wurde jedoch eine Hemmung der basalen ASC-Migration bei Antagonisierung des TRPV1 nachgewiesen. Der TRPV1 reguliert als nicht-selektiver Kationenkanal u. a. den zytosolischen Ca²⁺-Spiegel [Ridley, 2003] und ist durch Aktivierung kalziumsensitiver Enzyme wie MLCK oder Calpain an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt [Waning *et al.*, 2007]. Die Beeinflussung dieses entscheidenden Schrittes der Zellmigration ist möglicherweise die Ursache für die in dieser Arbeit festgestellte Beeinflussung der basalen Migration via Aktivierung des TRPV1 und stimmt mit Ergebnissen anderer Gruppen überein. So war TRPV1 nachweislich in die Migration der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 [Schilling und Eder, 2009], von humanen Hepatoblastomzellen [Waning *et al.*, 2007] und murinen *pulmonary arterial smooth muscle cells* (PASMC) [Martin *et al.*, 2012] involviert.

Bezugnehmend auf die Rolle des GPR55 bei der Zellmigration steigerte abn-CBD konzentrationsabhängig die Migration von HUVEC und aktivierte ERK und PI3K [Schicho *et al.*, 2011]. Diese abn-CBD-induzierte Migration wurde über einen G_i/G_o-gekoppelten Rezeptor, der weder CB₁ noch CB₂ darstellt, vermittelt. Da abn-CBD als Agonist am abn-CBD sensitiven Rezeptor und am GPR55 agiert, kommen beide Rezeptoren dafür in Frage. Eine andere Arbeit zeigte einen synergistischen *Crosstalk* zwischen GPR55 und CB₂ bezüglich einer LPI- (endogener GPR55-Agonist) und 2-AG-induzierten Polarisierung und Chemotaxis von humanen Neutrophilen, welcher über die kleinen GTPasen vermittelt wurde [Balenga *et al.*, 2011]. Die Aktivierung des GPR55 bewirkte eine Hemmung der CB₂-vermittelten Rac2-Aktivierung. Weitere Studien konstatierten eine über einen abn-CBD sensitiven Rezeptor und CB₂ vermittelte promigrative Wirkung des synthetischen Cannabinoids *Arachidonylcyclopropylamid* [Franklin und Stella, 2003] bzw. des

Endocannabinoids 2-AG [Walter *et al.*, 2003] in der murinen Mikroglia-Zelllinie BV-2. Des Weiteren wurde in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 eine Migrationssteigerung nach LPI-Stimulation [Ford *et al.*, 2010] und in HDMEC via GPR55 [Zhang *et al.*, 2010] nachgewiesen. Zusammengefasst wurde eine GPR55- bzw. abn-CBD-sensitive rezeptorvermittelte Migrationssteigerung nachgewiesen, welche in einigen Fällen mit einer parallelen Aktivierung des CB₂ einherging. Der in dieser Arbeit festgestellte promigrative Effekt der GPR55-Antagonisten CBD und O-1918 scheint im Gegensatz zu den oben genannten Studien zu stehen und weist auf zelltypspezifische Effekte des GPR55 bei der Migration hin.

Welcher Signalweg via GPR55 in ASC konstitutiv aktiv ist und hier funktionell inhibiert wird, ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre eine konstitutive Hemmung der Rac2-Aktivierung via GPR55 [Balenga *et al.*, 2011]. Bei Antagonisierung des GPR55 im Zusammenspiel mit einer Aktivierung der Rho-GTPasen via CB₂ [Kishimoto *et al.*, 2003; Kurihara *et al.*, 2006] könnte die Rac2-Aktivierung noch weiter verstärkt werden.

5.1.3 Am promigrativen Effekt von CBD beteiligte Kinasen

Die hier nachgewiesene Schlüsselstellung der ERK bei der cannabinoidinduzierten Migration von ASC stimmt mit zahlreichen anderen Arbeiten überein, in denen MEK-Inhibitoren die Zellmigration als Reaktion auf Zellmatrixproteine (wie Fibronectin oder Kollagen), auf Wachstumsfaktoren (wie VEGF, EGF oder Insulin) oder andere Stimuli wie FKS hemmten [siehe Übersichtsartikel Huang *et al.*, 2004]. Weitere Studien zeigten in Übereinstimmung dazu, dass aktivierte MEK1 die Migration diverser Zelltypen fördert [Jo *et al.*, 2002; Klemke *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 2000].

Eine funktionelle ERK-Aktivierung bei promigrativen Effekten von Cannabinoiden wurde auch bei Stimulation mit Methanandamid in humanen endometrialen Stromazellen [Gentilini *et al.*, 2010] und mit 2-AG in differenzierten HL-60-Zellen [Kishimoto *et al.*, 2003] und murinen Mikroglia [Walter *et al.*, 2003] nachgewiesen.

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit mit PI3K/Akt und JNK weitere Kinasen ermittelt, welche jedoch nur partiell an der promigrativen Wirkung von CBD beteiligt sind. Dies stimmt mit den Ergebnissen mehrerer anderer Arbeiten überein. So vermittelten alle drei Kinasen die EGF-induzierte Migration humaner Linsenepithelzellen [Jiang *et al.*, 2006], die durch Estradiol initiierte Migration in der humanen Brustkrebszelllinie T47D [Li *et al.*, 2010] oder die WIN55,212-2- und Capsaizin-induzierte Migration immortalisierter humaner Corneaepithelzellen [Yang *et al.*, 2010]. In weiteren Arbeiten führte bereits die Aktivierung von PI3K und JNK zu einer Migrationssteigerung in murinen Fibroblasten [Kanazawa *et al.*, 2010], humanen Alveolarkarzinomzellen [Lo *et al.*, 2013] oder bovinen *pulmonary artery smooth muscle cells* [Wei *et al.*, 2010].

Ferner wird die hier gezeigte partielle Hemmung der ERK-Aktivierung durch den spezifischen und stabilen PI3K-Inhibitor LY294002 (IC_{50} von $1,4 \mu M$, Vlahos *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 2000) auch durch andere Arbeiten über Zellmigrationsprozesse bestätigt. So ging die durch den CB_2 -Agonisten HU308 induzierte Zellmigration in der murinen osteoblastähnlichen Zelllinie MC3T3-E1 mit einer ERK-Aktivierung einher, welche partiell durch den PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt wurde [Sophocleous *et al.*, 2011]. In einer weiteren Studie mit humanen immortalisierten Cornea-Epithelzellen [Wang *et al.*, 2009] bewirkte eine PI3K-Hemmung die Inhibierung der EGF-induzierten Migration, der ERK-Aktivierung und der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Hemmung. Sie postulierten, dass durch die Aufhebung der GSK-3-Hemmung die Mitogen Kinase Proteinphosphatase-1 (MKP-1) aktiviert wird, welche wiederum die MEK1 dephosphoryliert und dadurch die EGF-induzierte Migration hemmt (siehe Abbildung 32).

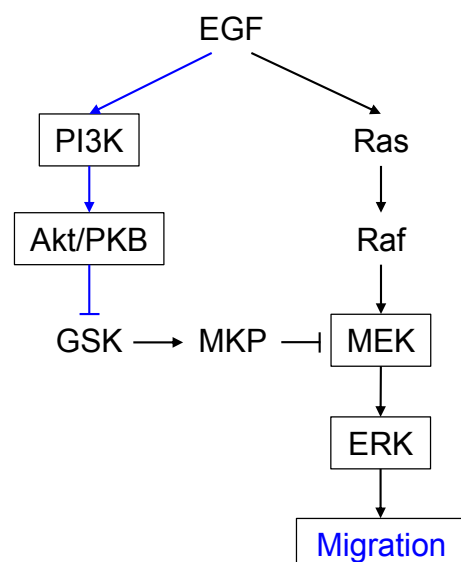


Abbildung 32: Modell einer PI3K geförderten ERK-vermittelten Migration

EGF induziert via Ras/Raf/MEK die Aktivierung von ERK und dadurch die Migration humaner Cornea-Epithelzellen. Konstitutiv aktive Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK) stabilisiert die Mitogen Kinase Proteinphosphatase 1 (MKP), welche die MEK dephosphoryliert und somit die ERK-Aktivierung hemmt. Durch EGF wird neben Ras transient PI3K aktiviert und via Akt/PKB die GSK-Aktivierung inhibiert und die ERK-Aktivierung und Migration verstärkt.

Abbildung entnommen und modifiziert aus Wang *et al.* (2009).

Des Weiteren wurde die hier konstatierte partielle ERK-Hemmung durch SP600125 in mindestens zwei weiteren Arbeiten beschrieben [Kang *et al.*, 2005; Minutoli *et al.*, 2004]. Eine Arbeitsgruppe stellte in einem murinen Caerulein-induzierten Pankreatitis-Modell eine fast vollständige Aufhebung der JNK-Phosphorylierung und eine 45 %ige ERK-Hemmung durch SP600125 fest [Minutoli *et al.*, 2004]. Eine zweite Gruppe untersuchte die Rolle der MAPK in der PDGF-induzierten Proliferation und Migration von humanen ASC [Kang *et al.*, 2005]. Dabei erwies sich JNK als wichtige Komponente der Signalweiterleitung. Darüber hinaus beobachteten sie eine 25 %ige Hemmung der ERK-Aktivierung durch SP600125, obwohl ERK nicht funktionell in die PDGF-induzierten Effekte involviert war. Da in der letzten Studie ebenfalls mit humanen ASC gearbeitet wurde, kann dies auf einen zellspezifischen Effekt dieses Inhibitors auf die ERK hindeuten. Selbstverständlich ist eine partielle Aktivierung der ERK durch JNK möglich, aber nach derzeitigem Erkenntnisstand nicht zu erklären.

Bei der Analyse einer Reihenfolge in den Kinaseaktivierungen wurden auch Hemmeffekte auf basale Kinaseaktivierungen konstatiert: SP600125 inhibierte die Aktivierung der Akt/PKB und PD98059 die der JNK. Durch die Wirkung der Inhibitoren auf die basale Proteinaktivierung wurden ihre Effekte auf die jeweilig gehemmte Kinase ausgeschlossen. Dies wurde von anderen Studien mit ähnlich unerwarteten Effekten bestätigt.

Das Anthrinderivat SP600125 ist ursprünglich als selektiver und reversibler ATP-kompetitiver Inhibitor der JNK1-3 identifiziert worden ($IC_{50} = 0,04-0,09 \mu M$) [Bennett *et al.*, 2001]. Es wurden jedoch auch Effekte auf zahlreiche andere Kinasen nachgewiesen: MKK4, $IC_{50} = 0,4 \mu M$; Akt/PKB, $IC_{50} = 1 \mu M$ [Bennett *et al.*, 2001]. So hemmte SP600125 in einer japanischen Studie nahezu komplett die *Fc receptor for IgE* (Fc ϵ RI)-induzierte Akt/PKB-Phosphorylierung und PIP₃-Produktion in murinen Knochenmarkmastzellen, welche in einer fast vollständigen Aufhebung der Serotoninausschüttung und Genexpression von Zytokinen resultierte [Tanemura *et al.*, 2009]. Dieser Effekt, vergleichbar stark wie der durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin, konnte von den Autoren nicht in Mastzellen aus MKK7-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. SP600125 wirkte demnach unabhängig von einer Aktivierung der JNK auf die PI3K-Aktivität in murinen Mastzellen. Da die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Hemmung der Akt/PKB-Aktivierung durch SP600125 in allen Versuchen (mit oder ohne Stimulation mit CBD) nach 0,5 h, aber auch nach 4 h (Daten nicht gezeigt) Inkubationszeit festgestellt wurde, ist von einem unspezifischen Effekt von SP600125 auf die PI3K oder direkt auf Akt/PKB auszugehen.

Bezüglich der Inhibierung der JNK durch den MEK1-Hemmer PD98059 und den dafür notwendigen *Crosstalks* zwischen der MKK4/7/JNK- und der MEK/ERK-Kaskade gibt es mehrere Belege für *dual specificity phosphatases* (DUSPs) vermittelte Hemmeffekte zwischen JNK und ERK [siehe Übersichtsartikel Fey *et al.*, 2012]. In zwei Studien wurde auch eine Wechselwirkung auf übergeordneter Ebene, höchstwahrscheinlich der MEKK1, gezeigt [Salh *et al.*, 2000; Waetzig und Herdegen, 2005]. Diese auch in die Migration involvierte MAP3K [Su *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005] aktiviert in der Regel die MKK4/7 und somit JNK, in einigen Fällen eher die MEK1 und damit ERK [Witowsky und Johnson, 2003; Yujiri *et al.*, 1998]. In den oben genannten Arbeiten hemmten die selektiven und nicht kompetitiven MEK1-Inhibitoren PD98059 und U0126 [Davies *et al.*, 2000] die Phosphorylierung der JNK in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 [Salh *et al.*, 2000] bzw. der murinen Nebennierenphäochromozytom-Zelllinie PC-12 [Waetzig und Herdegen, 2005]. In letzterer Studie zum Wachstum von Neuriten postulierten Wätzig und Herdegen, dass MKK7 und MEK1 um dieselbe Bindungsstelle an MEKK1 konkurrieren und es durch PD98059 zu einer Konformationsänderung der MEK1 kommt, wodurch schließlich die Interaktion zwischen MEKK1 und MEK1 zu Lasten des MKK7/JNK-Signalweges verstärkt wird (siehe Abbildung 33, Seite 87). Demzufolge würde PD98059 die MEK1-Aktivität und damit ERK-Phosphorylierung und gleichzeitig durch Senkung der MKK7-Aktivierung durch MEKK1 die Phosphorylierung der JNK hemmen. Diese Theorie widerspricht jedoch Studien, die für PD98059 eine allosterische Hemmung der nicht aktivierten MEK1 und eine

resultierende Blockierung der Bindungsstellen für aktivierende Enzyme zeigen [Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995]. Eine verstärkte Interaktion von MEK1 mit ihrer Aktivierungskinese MEKK1 wäre hierdurch nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hemmung der basalen wie auch CBD-induzierten JNK-Aktivierung durch PD98059 bereits nach 0,5 h (Daten nicht gezeigt) festgestellt. Da es bisher keine veröffentlichten Daten für eine Aktivierung der JNK durch die MEK oder ERK gibt, ist eine Wechselwirkung auf vorgeschalteter Ebene sehr wahrscheinlich.

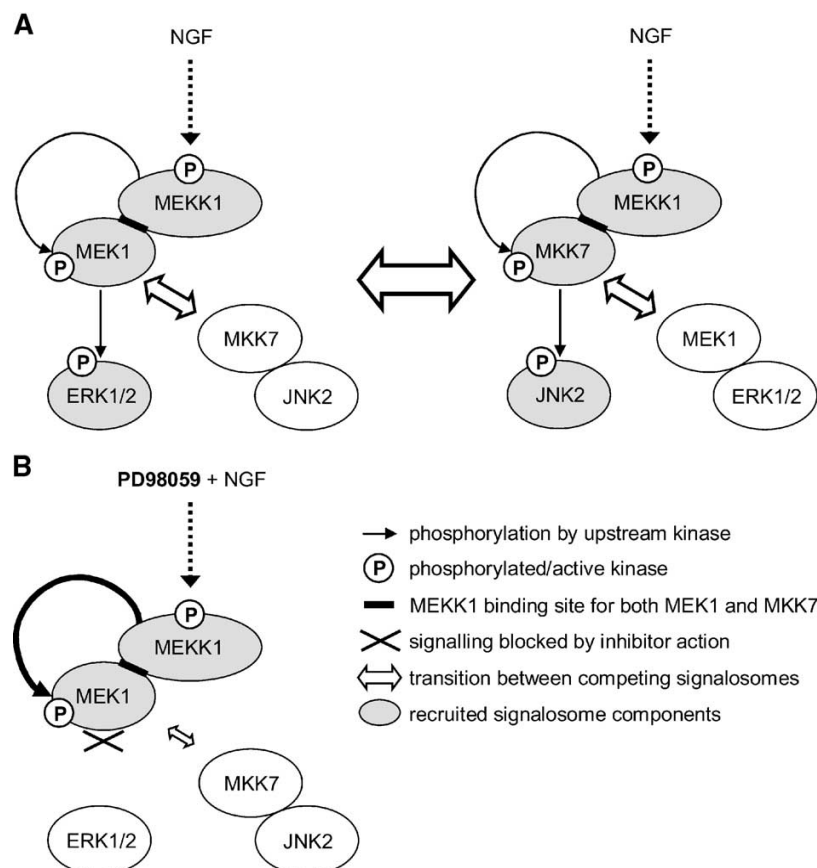


Abbildung 33: Möglicher Crosstalk zwischen den MEK1/ERK- und MKK7/JNK-Kaskaden

MEK1 und MKK7 konkurrieren in dieser Hypothese um dieselbe Bindungsstelle an MEKK1. Bei Aktivierung der MEKK1 durch NGF (*nerve growth factor*) wird entweder MKK7 oder MEK1 gebunden und phosphoryliert. Eine Inhibierung der MEK1 durch PD98059 führt zu einer verstärkten Interaktion zwischen MEK1 und MEKK1 zu Lasten des MKK7/JNK-Signalweges. Diese Hypothese erklärt die geringere Aktivierung von MKK7/JNK als Folge einer MEK1-Inhibierung. Die Abbildung ist entnommen aus Waetzig und Herdegen (2005).

Obwohl die CBD-induzierte Akt/PKB-Aktivierung zumindest tendenziell via CB₂ und GPR55 vermittelt wurde, muss nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auf eine rezeptorunabhängige Aktivierung der Akt/PKB und JNK durch CBD geschlossen werden. CBD vermittelt seine Effekte auch über andere Rezeptoren (Adenosin A_{2A} Rezeptor, Serotonin- und Opioidrezeptor) und Ionenkanäle (TRPA1, TRPV2) [siehe Übersichtsartikel Izzo *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012) oder auch rezeptorunabhängig über sog. *lipid rafts* [Fisar, 2009]. In mehreren Studien wurden für TRPV2 [Liu und Wang, 2013; Oulidi *et al.*,

2013] und TRPA1 [Hayashi *et al.*, 2007] eine Beteiligung an Migrationsprozessen gezeigt. Dasselbe gilt für *lipid rafts*, kleine Bereiche in Lipidmembranen, in welchen sich Cholesterin, Glykolipide und Sphingolipide anreichern [Babina *et al.*, 2014; Gutierrez *et al.*, 2014]. Ferner wurden bereits *lipid raft*-abhängige AEA-induzierte Phosphorylierungen der JNK [Giuliano *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011; Sarker und Maruyama, 2003] und Aktivierungen der PI3K/Akt [Gao *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2013] nachgewiesen.

5.1.4 Promigrative Wirkung von THC auf ASC

Um den Effekt von CBD auf die Migration von ASC und die zentrale Rolle der ERK in der zugrundeliegenden Signalweiterleitung zu bekräftigen, sollte ein weiteres Cannabinoid auf seine Wirkung hin getestet werden. Dafür wurden die zentralen CBD-Versuche zur Migration und ERK-Aktivierung mit THC wiederholt. In diesen Experimenten wurde eine ERK-, CB₁- und CB₂-vermittelte Migrationssteigerung nach Stimulation mit THC festgestellt. Dies stützt sich auf folgende Ergebnisse: **(I)** THC steigerte die Migration der ASC, wobei dieser Effekt durch Inhibition der ERK vollständig aufgehoben und durch Antagonisierung des CB₁ und CB₂ gehemmt wurde; **(II)** die ERK wurde innerhalb des Migrationszeitfensters aktiviert; **(III)** die THC-induzierte ERK-Aktivierung wurde bei der Antagonisierung des CB₁ und des CB₂ gehemmt; und **(IV)** weder die Hemmung des TRPV1 noch die Aktivierung des GPR55 hatten eine Wirkung auf Migration oder ERK-Aktivierung.

Der Einfluss des psychoaktiven Cannabinoids THC auf die Zellmigration wurde bisher vorwiegend in Tumorzelllinien oder Immunzellen untersucht. So induzierte THC die Migration in humanen endometrialen HEC 1B-Zellen [McHugh *et al.*, 2012], zeigte jedoch eine hemmende Wirkung auf die Migration von murinen Mikroglia BV-2 [Fraga *et al.*, 2011], Cholangiokarzinomzellen [Leelawat *et al.*, 2010] und humanen Monozyten der Zelllinie U937 [Raborn und Cabral, 2010]. Es gibt keine Daten bezüglich einer Migrationswirkung auf undifferenzierte Zellen oder Stammzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass THC, wie auch CBD, zellspezifische Effekte bezüglich der Migration ausüben. Beide Cannabinoide hemmten die Migration von Tumorzellen und Zellen des Immunsystems, wirkten aber promigrativ auf Vorläuferzellen wie MSC.

Die promigrative Wirkung von THC wurde in den hier durchgeführten Versuchen über den CB₁ und CB₂, nicht aber über den TRPV1 und GPR55 vermittelt. THC teilt mit AEA und 2-AG die Fähigkeit, beide klassischen Cannabinoidrezeptoren zu aktivieren, und bindet im Gegensatz zu CBD mit K_i-Werten im nanomolaren Bereich: CB₁K_i = 5,05 - 80,3 nM und CB₂K_i = 3,13 - 75,3 nM [Pertwee, 2008]. Die Affinität zu den Rezeptoren ist ungefähr gleich stark ausgeprägt, wobei einige Arbeiten auch eine ca. 1,6fach stärkere Affinität zum CB₁ als zum CB₂ zeigten [Felder *et al.*, 1995; Showalter *et al.*, 1996]. Dies würde mit den Ergebnissen übereinstimmen, dass die THC-induzierte Migration und ERK-Aktivierung in den ASC jeweils stärker bei Antagonisierung des CB₁ inhibiert wurde.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen belegen auch andere Studien CB₁- und CB₂-vermittelte migrative Wirkungen von Cannabinoiden. Beispielweise inhibierten AEA und 2-AG die Migration von Prostatakarzinomzellen durch Aktivierung des CB₁ und Hemmung der RhoA-Aktivität [Nithipatikom *et al.*, 2012]. Im Gegensatz dazu wiesen Trophoblastzellen aus CB₁-Knockout-Mäusen eine geringe Mobilität und Ausbreitung als Trophoblasten aus Wildtyp-Mäusen auf [Xie *et al.*, 2012]. Ferner erhöhte eine AEA-induzierte Aktivierung des CB₁ *in vitro* und *in vivo* die Migration von murinen GABAergen Interneuronen [Berghuis *et al.*, 2005]. Zudem minderte eine Inhibierung des CB₁ die Neuroblastmigration in Gewebekulturen aus der subventrikulären Zone von Mäusegehirnen [Gaffuri *et al.*, 2012; Oudin *et al.*, 2011]. Die Migration der Neuroblasten konnte darüber hinaus durch die Agonisten Arachidonyl-2-chloroethylamid (ACEA; CB₁) und JWH-133 (CB₂) gefördert und auch bei Antagonisierung des CB₂ gehemmt werden. In humanen immortalisierten Trabekelmaschenzellen induzierte THC seine antimigratorische Wirkung ebenfalls über beide Cannabinoidrezeptoren [Ramer und Hinz, 2010]. Übereinstimmend mit der Tatsache, dass der CB₂ hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, wurden THC-Effekte auf die Migration von Mikroglia oder Makrophagen vorwiegend über Aktivierung des CB₂ vermittelt [Fraga *et al.*, 2011; Raborn und Cabral, 2010].

Bezüglich des GPR55 gilt THC vorwiegend als Rezeptoragonist. Hierbei wurde ein Agonismus in Studien gezeigt, welche als Messmethoden die Mobilisierung von Ca²⁺-Ionen oder einen [³⁵S]GTPγS Assay gewählt hatten. [Lauckner *et al.*, 2008; Ross, 2009; Ryberg *et al.*, 2007]. Via ERK-Aktivierung konnte bisher jedoch keine eindeutige Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden [Lauckner *et al.*, 2008; Oka *et al.*, 2007]. Dies lässt vermuten, dass die von THC via GPR55 induzierten Signalwege nicht oder nur in geringem Maße in einer ERK-Aktivierung resultieren. Entsprechend der antagonistisch am GPR55 vermittelten promigrativen Wirkung von CBD hatte die GPR55-Aktivierung durch THC keinen Effekt auf die Migration von ASC. Dass THC in der vorliegenden Arbeit seine promigrative Wirkung nicht über den TRPV1 vermittelt, steht in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die ebenfalls keine Interaktion von THC mit TRPV1 zeigen konnten [Lam, 2005].

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Steigerung der ASC-Migration durch CBD und THC ist der zweite Nachweis für eine cannabinoidinduzierte Migrationssteigerung in MSC. In einer anderen Studie wurde eine 2-AG-induzierte chemotaktische Migration von Knochenmark-MSC gezeigt, welche übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen bei Hemmung des CB₂ aufgehoben wurde [Rossi *et al.*, 2013].

5.2 Osteogene Differenzierung

In osteogenen Differenzierungsexperimenten wurde eine weitere potentielle Regenerationswirkung von CBD untersucht. Es wurde gezeigt, dass CBD die osteogene Differenzierung von ASC fördert. Dies resultierte aus einem Anstieg der ALP-Aktivität und einer verstärkten Mineralisierung der ECM. Diese Ergebnisse wurden von mRNA-Analysen bestätigt, die eine CBD-induzierte Hochregulation mehrerer osteogen assoziierter Gene, wie ALPL, BMP2, BMP4 und ENAM, zeigten. Darüber hinaus war die Induktion der osteogenen Differenzierung durch CBD von einer geringeren Proliferationsrate und einer höheren metabolischen Aktivität der ACS gekennzeichnet.

5.2.1 CBD hemmt die Proliferation der ASC

Innerhalb der fünfwöchigen Inkubationszeit stiegen die Zellzahlen der Vehikel- wie CBD-behandelten ASC kontinuierlich an. Dabei fiel der Anstieg bei CBD-Stimulation geringer aus. Unter den hier bestehenden Niedrigserum-Bedingungen setzen CBD-stimulierte ASC die Proliferation zu Gunsten einer höheren osteogenen Differenzierung herab.

Ein hemmender Effekt von CBD auf die Proliferation wurde auch in anderen Studien gezeigt, z. B. mit HUVEC [Solinas *et al.*, 2012], verschiedenen Brustkrebszelllinien [Ligresti *et al.*, 2006] oder Lungenkrebszellen [Ramer *et al.*, 2013]. Dabei wurde die Viabilität primärer Lungentumorzellen bereits bei nanomolaren CBD-Konzentrationen [Ramer *et al.*, 2013] und von HUVEC erst ab 9 μ M CBD [Solinas *et al.*, 2012] signifikant beeinträchtigt, was erneut auf eine zelltypspezifische Wirkung von CBD schließen lässt.

5.2.2 CBD fördert die metabolische Zellaktivität

Da MSC in ihrer biologischen Nische vorwiegend sauerstoffarme Bedingungen vorfinden, gilt eine geringere mitochondriale Oxidation als Indikator für den Stammzellcharakter einer Zelle [Rehman, 2010]. So wurde in undifferenzierten humanen MSC eine erhöhte Konzentration an glykolytischen Enzymen und eine verstärkte Laktatproduktion festgestellt [Chen *et al.*, 2008]. In derselben Studie lagen unter osteogenen Differenzierungsbedingungen hingegen mehr mitochondriale DNA, respiratorische Enzyme und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch vor, was für einen verstärkten mitochondrialen Stoffwechsel spricht. Ferner wurde von anderen Arbeitsgruppen Hemmungen der osteogenen Differenzierung unter Hypoxiebedingungen festgestellt [Hsu *et al.*, 2013; Malladi *et al.*, 2006; Tuncay *et al.*, 1994]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Erhöhung des mitochondrialen, oxidativen Metabolismus in CBD-stimulierten ASC stimmt mit einem verstärkten osteogenen Differenzierungsgrad überein.

5.2.3 CBD fördert die osteogene Differenzierung der ASC *in vitro*

In den CBD-stimulierten ASC wurde nach 35 d Inkubationszeit eine signifikante Erhöhung der ALP-Aktivität und ECM-Mineralisierung um 43 % bzw. 45 % gegenüber der vehikelbehandelten Gruppe festgestellt. Nach 28 d CBD-Stimulation stiegen die Kresolphthalein-Werte auf das 3-Fache der Vehikelkontrolle. Es wurde also ein Anstieg der Mineralisierung in den Rohwerten und im Vergleich zum Vehikel festgestellt.

CBD erhöhte in den ASC die Aktivität und mRNA-Expression der ALP. Die CBD-induzierte ALPL-Expression war im Vergleich zum Vehikel nach 3 Tagen leicht und nach 14 Tagen deutlich erhöht. Das absolute Expressionslevel stieg bezogen auf Tag 0 erst deutlich an (3 d) und fiel anschließend wieder ab (14 d; siehe Anhang in Tabelle 18, Seite xxi). Übereinstimmendes gilt für die ALP-Aktivität, welche kontinuierlich ab dem 7. Tag auf das 0,6–0,7-Fache am 35. Tag absank.

Die ALPL gehört zu den ersten Genen, deren Expression im Mineralisierungsprozess gesteigert wird [Golub und Boesze-Battaglia, 2007]. Sie wurde hier in allen drei Gruppen (VK, CBD, OS) früh hochreguliert. Dass der anschließende Expressionsabfall bei Stimulation mit CBD und OS bedeutend schwächer ausfiel, lässt auf eine längere ALPL-Aktivierung schließen. Auf mRNA- und Aktivitätsebene ist also zu erkennen, dass unter Niedrigserum-Bedingungen die ALP früh am stärksten induziert wird und das Aktivierungslevel danach wieder absinkt. Laut Hoemann und Kollegen sind bereits geringe ALP-Konzentrationen (0,05 nmol/min/mg Protein) ausreichend, um genügend Glycerophosphat in anorganisches Phosphat umzuwandeln und der Mineralisierung bereitzustellen [Chung *et al.*, 1992; Hoemann *et al.*, 2009]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass unter Niedrigserum-Bedingungen bei osteogener Stimulation auch ohne stetiges Ansteigen der ALP-Aktivierung genügend Phosphat generiert wurde, um eine Mineralisierung der ECM zu ermöglichen. Bei CBD-stimulierten ASC wird vor allem die im Gegensatz zu vehikelbehandelten Zellen länger anhaltende ALP-Aktivierung, welche nach 14 d auf mRNA- und nach 28 d auf Aktivitätsebene über Vehikelniveau lag, Ursache für eine ausreichende bzw. bessere Phosphatversorgung gewesen sein.

Andere *in vitro*-Studien zur osteogenen Differenzierung von MSC untersuchten v. a. osteogen stimulierende und nicht osteoinduktive Effekte [Lieder und Sigurjonsson, 2014; Liu *et al.*, 2014]. So erhöhte das Parathormon (PTH, Wirkstoff des einzigen zugelassenen osteoanabolen Therapeutikums Teriparatid) in Studien mit humanen Knochenmarkstammzellen bei osteogener Stimulation die Mineralisierung (an Tag 21) um weitere ~50 % bzw. ~150 % [Pountos *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011]. *In vivo* wurde in klinischen Studien nach täglicher Verabreichung von Teriparatid über 18 Monate an Osteoporosepatienten eine Steigerung der vertebrealen Knochendichte um 8,3–9 % und der des Oberschenkelhalses um 3–3,5 % nachgewiesen [McNeilly *et al.*, 2013; Neer *et al.*, 2001]. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern den ersten Hinweis für eine osteoanabole

Wirkung von Cannabinoiden auf MSC. Eine klinische Relevanz des CBD-Effektes sollte in klinischen Studien geklärt werden.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welche Gene in die Vermittlung des CBD-Effektes involviert sind, wurde in einem Genarray (TaqMan® Arrays Human Osteogenesis) die Expression von 92 osteogen assoziierten Genen untersucht. Diese Gene sind an der Determinierung und Differenzierung von Osteoblasten, aber auch an physiologischen Prozessen des Knochen- und Zahnaufbaus beteiligt. Neben der oben erwähnten ALPL wurde auch eine Reihe anderer Gene durch CBD ähnlich wie in der osteogenen Kontrolle reguliert.

Das gilt zum Beispiel für die Arylsulfatase E (ARSE), die zur Familie der Sulfatasen gehört, und für den korrekten Aufbau der Knochen und Knorpelmatrix essentiell ist [Baitner *et al.*, 2000]. Die *bone morphogenetic proteins* hingegen gehören zu der TGFβ-Superfamilie und induzieren die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten und fördern deren weitere Differenzierung und Funktion [Canalis *et al.*, 2003]. VEGF ist durch Stimulierung der Angiogenese wichtig für die Kopplung von Knorpelresorption und Knochenmineralisierung während der endochondralen Ossifikation [Gerber *et al.*, 1999]. In der Kombination wurden für VEGF und BMP-2 [Samee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014] oder VEGF und BMP-4 [Peng *et al.*, 2002] sogar synergistische Effekte auf die Knochenneubildung und Osteoblastendifferenzierung gezeigt.

Kollagene sind für den Aufbau der extrazellulären Matrix essentiell. Im menschlichen Körper stellen sie mit über 30 % der Proteing Gesamtmasse die am häufigsten vorkommenden Proteine dar [Bruckner-Tuderman und Bruckner, 1985]. Speziell COL4A5 und COL9A2 kodieren für Typ IV -und Typ IX-Kollagene. Wobei erstere die Hauptstrukturkomponenten der Basalmembran [Storlazzi *et al.*, 2006], und letztere des hyalinen Knorpels darstellt. Mutationen von COL9A2 gelten zudem als genetischer Risikofaktor für Bandscheibenvorfälle [Wrocklage *et al.*, 2000].

Die *homeodomain proteins* MSX-1 und MSX-2 sind von zentraler Bedeutung bei der embryonalen craniofazialen Entwicklung, insbesondere bei der Programmierung der Osteo- und Odontoblasten [Satokata *et al.*, 2000; Satokata und Maas, 1994]. Des Weiteren stellt MSX2 ein direktes Gentarget von BMP2 dar und verstärkt bei zusätzlicher Aktivierung den BMP-2-Effekt auf die Mineralisierung [Matsubara *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2011].

Die Koloniestimulierenden Faktoren 2 (Granulozyten/Makrophagen) und 3 (Makrophagen) kontrollieren v. a. die Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten und Makrophagen, stimulieren aber auch die Aktivierung der Osteoklasten *in vivo* und fördern die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen [Li *et al.*, 2013]. Es kommt also nicht nur zu einer einseitigen Förderung des Knochenaufbaus, sondern zur Unterstützung der beiden Seiten des *bone remodelings*.

Interessanterweise wurde die stärkste durch CBD induzierte Expressionssteigerung bei Enamelin festgestellt. Enamelin ist eines der wichtigsten kalziumbindenden Phosphoproteine

welches nicht nur entscheidend an der Mineralisierung und Strukturierung des Zahnschmelzes sondern auch des Knochens, beteiligt ist [Fuchs *et al.*, 2012].

Zusammenfassend wurde durch CBD eine Vielzahl von Genen aktiviert, die in den Knochenumbau, v. a. den Knochenaufbau, involviert sind. Dies unterstützt die Ergebnisse aus den ALP-Aktivitäts- und Mineralisierungsassays, welche eine osteoinduktive Wirkung von CBD erkennen ließen.

Bisher gibt es nur eine weitere Studie über den Einfluss von Cannabinoiden auf die Differenzierung von MSC. In dieser Arbeit wurde ein negativer Einfluss von THC auf die metabolische Aktivität und ECM-Mineralisierung von murinen Knochenmark-MSC festgestellt [Gowran *et al.*, 2013]. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstützen jedoch eine osteoanabole Wirkung von Cannabinoiden auf MSC, welche vor dem Hintergrund der Migrationsversuche und der Literaturdaten über eine CB₂-Aktivierung und GPR55-Antagonisierung vermittelt werden könnte. Dies würde mit einigen einleitend genannten Befunden [Bab, 2007; Sophocleous *et al.*, 2011] übereinstimmen, welche ebenfalls osteoprotektive bzw. osteoinduktive Effekte von Cannabinoidrezeptoragonisten konstatierten.

5.3 Schlussfolgerung & Ausblick

Bezüglich der eingangs formulierten Fragestellungen dieser Arbeit konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Cannabinoide wie CBD und THC haben eine promigrative Wirkung auf MSC.
2. Zudem konnte der zugrundeliegende Mechanismus teilweise aufgeklärt werden.
3. Cannabinoide könnten zum Knochenaufbau beitragen, da sie die osteogene Differenzierung der ASC fördern.

Um diese Ergebnisse zu untermauern bzw. näher zu analysieren sind jedoch weitere Experimente notwendig. Beispielsweise wurde in der vorliegenden Arbeit eine Inhibierung der ASC-Migration durch den TRPV1-Antagonisten Capsazepin festgestellt. In weiterführenden Versuchen könnte eine mögliche promigrative Wirkung von TRPV1-Agonisten, wie Capsaizin, geklärt werden. Bei positiven Resultaten sollten Migrationsanalysen in Kombination mit CBD durchgeführt werden, um mögliche additive oder synergistische Effekte beider Cannabinoidrezeptorliganden bei der cannabinoidinduzierten Migration zu untersuchen.

Ferner könnte durch eine kombinierte Präinkubation mit GPR55-Agonisten und CB₂-Antagonisten ein potentieller *crossstalk* zwischen den beiden Rezeptoren bei der CBD-induzierten Migration analysiert werden. Ferner sollte durch Einsatz spezifischer Inhibitoren (z. B. EHT1864, ML141) die Rolle der kleinen Rho-GTPasen bei der cannabinoidinduzierten Migration untersucht werden.

Des Weiteren würden Migrationsanalysen mit weiteren Cannabinoiden und Präinkubationen mit den bereits verwendeten Rezeptor(ant)agonisten und Kinaseinhibitoren den zugrundeliegenden Mechanismus der cannabinoidinduzierten Migration von MSC weiter aufklären.

Bezüglich der Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch Cannabinoide könnten osteoinduktive Effekte von Inhibitoren der Anandamid-abbauenden FAAH untersucht werden. Dadurch könnte geklärt werden, ob die längere Verfügbarkeit von Endocannabinoiden im Knochen zum Knochenaufbau beiträgt.

Darüber hinaus sollte die Cannabinoidrezeptorexpression während der Differenzierung analysiert (mittels PCR bzw. Western Blot) und auch die Wirkung von Cannabinoidrezeptor-Antagonisten auf die osteogene Differenzierung von MSC untersucht werden.

Ferner sollten die vielversprechenden in vitro-Ergebnisse bezüglich eines osteoinduktiven CBD-Effektes auf ihre in vivo-Relevanz getestet werden. Dafür sollte der Einfluss von CBD auf die trabekuläre Knochendichte untersucht werden. Als Tiermodell würde sich mit Blick auf eine mögliche Osteoporoseindikation ovariektomierte Mäuse anbieten, da bei diesen Mäusen durch den Estrogenmangel eine Osteoporose induziert wird. Über einen Zeitraum von mindestens 28 Tagen sollte je eine Gruppe mit Vehikel oder CBD (5 mg/kg, intraperitoneal) behandelt werden. Die Dosis von 5 mg/kg CBD wurde in unserem Labor des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie bereits erfolgreich in einem In-vivo-Metastasierungsmodell an Thymus-aplastischen Nacktmäusen getestet [Ramer et al., 2010]. In anschließenden Paraffinschnitten und von-Kossa-Färbungen (Anfärben von Kalziumablagerungen im Knochen) der Femora und/oder durch den Einsatz eines Mikro-Computer-Tomographen könnten Knochendichte und –struktur bestimmt werden. Darüber hinaus wäre auch die Wirkung von CBD auf den Knochen gesunder Tieren und auf den Knochenheilungsprozess nach Brüchen von großem Interesse. Damit könnten mögliche gegenläufige Effekte bei gesunden Individuen ausgeschlossen und komplexe Prozesse, wie Knochenheilung, welche auch die Aktivierung und das Homing von MSC mit einschließen, näher beleuchtet werden.

6 Zusammenfassung

Cannabinoide vermitteln ein breites Spektrum pharmakologischer Effekte wie analgetische, antiemetische, orexigene und muskelrelaxierende Wirkungen. Neuere Studien belegen zudem eine Involvierung des Endocannabinoidsystems in Gewebeheilungsprozesse wie die Knochenregeneration. Inhalt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung cannabinoid-vermittelter Regulationen regenerativer Prozesse. Schwerpunkte lagen hierbei auf Untersuchungen zum Einfluss des nicht psychoaktiven Phytocannabinoids Cannabidiol (CBD) auf die Migration und die osteogene Differenzierung von *adipose tissue-derived stem cells* (ASC), die als zelluläres Modellsystem dienten.

Durch Migration zu geschädigten Gewebestellen und anschließender Differenzierung tragen mesenchymale Stammzellen (MSC) zur Geweberegeneration bei. Zur Quantifizierung der Migration wurden im vorliegenden Projekt modifizierte Boyden-Chamber-Assays durchgeführt. Zur Analyse der osteogenen Differenzierung wurden die ALP-Aktivität mittels Hydrolyse von Nitrophenylphosphat zu *para*-Nitrophenol und der Mineralisierungsgrad der extrazellulären Matrix mittels Kresolphthalein-Komplexierung der Kalziumionen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phytocannabinoide CBD und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) die Migration von ASC fördern. In beiden Fällen war die Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinase 1/2* (ERK) essentiell für die Vermittlung dieses Cannabinoid-Effektes. Die CBD-induzierte Migration und ERK-Phosphorylierung wurde über Aktivierung des CB₂ und Antagonisierung des GPR55 vermittelt, während bei THC-Stimulation der CB₁ und CB₂ in die entsprechende promigrative Wirkung involviert waren. Dies spricht für eine cannabinoidspezifische Rezeptorinvolvierung. Die Migrationssteigerung via CB₂-Aktivierung und GPR55-Antagonisierung konnte durch einen selektiven Rezeptoragonisten (JWH-133, CB₂) bzw. Rezeptorantagonisten (O-1918, GPR55) bestätigt werden. Es konnte zusätzlich die Beteiligung der PI3K und JNK am promigrativen CBD-Effekt gezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass PI3K/Akt zudem partiell an der CBD-induzierten ERK-Aktivierung beteiligt ist, während eine mögliche Aktivierung der ERK durch JNK noch geklärt werden muss.

In der vorliegenden Arbeit wurde in humanen ASC ein CBD-induzierter Anstieg osteogener Differenzierungsmarker (ALP-Aktivität, ECM-Mineralisierung) gezeigt. Unterstützt wurde dieser Befund durch die gesteigerte mRNA-Expression einiger wichtiger osteogen-assoziierten Gene, wie der ALPL, BMPs, Kollagene, VEGF oder ARSE.

Basierend auf diesen Ergebnissen könnte CBD auch *in vivo* die Mobilisierung von MSC unterstützen und dadurch die Wundheilung fördern. Zusätzlich könnte die Regeneration von Geweben mit Mineralisierungsdefekten durch eine osteoanabole Wirkung von CBD auf lokal aktivierte MSC verbessert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen somit nahe, dass CBD eine potentielle therapeutische Option bei der Behandlung osteodegenerativer Erkrankungen darstellt.

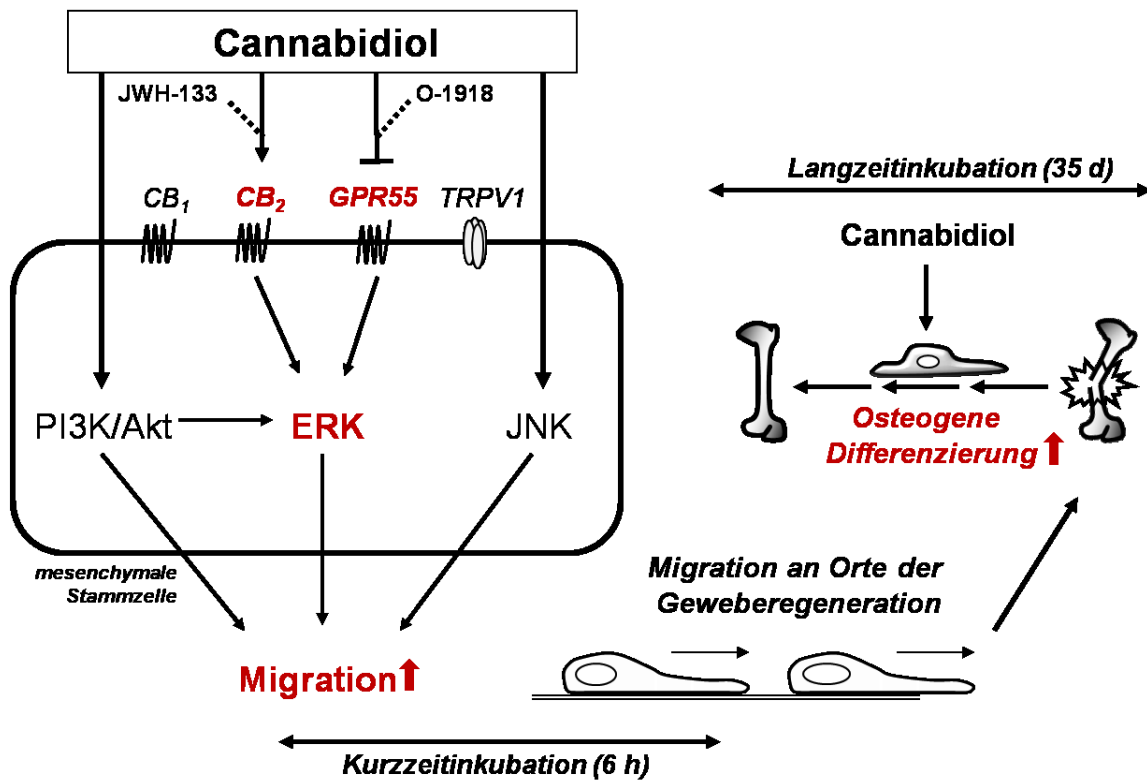


Abbildung 34: Schematische Darstellung der CBD-induzierten Migration und osteogenen Differenzierung in humanen ASC (nähere Erläuterungen siehe Text).

Abkürzungen: CB_1 , CB_2 ... Cannabinoidrezeptor 1 bzw. 2, $GPR55$... G-Protein gekoppelter Rezeptor 55; $TRPV1$... transient receptor potential vanilloid 1; JWH-133... CB_2 -Agonist; O-1918... $GPR55$ -Antagonist; ERK 1/2... extracellular signal-regulated kinase 1/2, $PI3K$... Phosphoinositid-3-Kinase; Akt... Proteinkinase B bzw. Akt; JNK... c-Jun N-terminale Kinase

7 Literaturverzeichnis

- Abood, M., Martin, B.** (1992) Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13:201–206.
- Aikin, R., Maysinger, D., Rosenberg, L.** (2004) Cross-Talk between Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT and c-Jun NH2-Terminal Kinase Mediates Survival of Isolated Human Islets. *Endocrinology* 145:4522–4531.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Kholodenko, B.** (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* 40:139–146.
- Alessi, D., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D., Saltiel, A.** (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489–27494.
- Atwood, B., Mackie, K.** (2010) CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol* 160:467–479.
- Bab, I.** (2007) Regulation of Skeletal Remodeling by the Endocannabinoid System. *Ann N Y Acad Sci* 1116:414–422.
- Bab, I., Ofek, O., Tam, J., Rehnelt, J., Zimmer, A.** (2008) Endocannabinoids and the Regulation of Bone Metabolism. *J Neuroendocrinol* 20:69–74.
- Babina, I., McSherry, E., Donatello, S., Hill, A., Hopkins, A.** (2014) A novel mechanism of regulating breast cancer cell migration via palmitoylation-dependent alterations in the lipid raft affiliation of CD44. *Breast Cancer Res* 16:R19.
- Baitner, A., Maurer, S., Gruen, M., Di Cesare, P.** (2000) The genetic basis of the osteochondrodysplasias. *J Pediatr Orthop* 20:594–605.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W., Hiley, C.** (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:1–4.
- Balenga, N., Aflaki, E., Kargl, J., Platzner, W., Schroeder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A., Heinemann, A., Waldhoer, M.** (2011) GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res* 21:1452–1469.
- Bennett, B., Sasaki, D., Murray, B., O'Leary, E., Sakata, S., Xu, W., Leisten, J., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y. et al.** (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13681–13686.
- Berghuis, P., Dobszay, M., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K., Schulte, G., Ernfors, P., Mackie, K., Paratcha, G. et al.** (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19115–19120.
- Berridge, M., Herst, P., Tan, A.** (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127–152.
- Bisogno, T., Hanus, L., Petrocellis, L. de, Tchilibon, S., Ponde, D., Brandi, I., Moriello, A., Davis, J., Mechoulam, R., Di Marzo, V.** (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845–852.
- Bobis, S., Jarocho, D., Majka, M.** (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 44:215–230.
- Boquest, A., Shahdadfar, A., Fronsdal, K., Sigurjonsson, O., Tunheim, S., Collas, P., Brinchmann, J.** (2005) Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 16:1131–1141.
- Bosier, B., Muccioli, G., Hermans, E., Lambert, D.** (2010) Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol* 80:1–12.
- Boyden, S.** (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115:453–466.

- Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P.** (1985) Collagen in current connective tissue research. Application of molecular biological methods to medical problems. *Hautarzt* 36:126–131.
- Cabral, G., Griffin-Thomas, L.** (2009) Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med* 11.
- Canalis, E.** (2009) Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem* 108:769–777.
- Canalis, E.** (2010) Update in New Anabolic Therapies for Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1496–1504.
- Canalis, E., Economides, A., Gazzero, E.** (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 24:218–235.
- Caplan, A.** (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341–347.
- Caplan, A., Bruder, S.** (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7:259–264.
- Cappellano, G., Uberti, F., Caimmi, P., Pietronave, S., Mary, D., Dianzani, C., Micalizzi, E., Melensi, M., Boldorini, R., Nicosia, G. et al.** (2013) Different expression and function of the endocannabinoid system in human epicardial adipose tissue in relation to heart disease. *Can J Cardiol* 29:499–509.
- Carvalho, P., Wu, X., Yu, G., Dias, I., Gomes, M., Reis, R., Gimble, J.** (2011) The Effect of Storage Time on Adipose-Derived Stem Cell Recovery from Human Lipoaspirates. *Cells Tissues Organs* 194:494–500.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M., Goldstein, L., Karin, M.** (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4:521–533.
- Chen, C.-T., Shih, Y.-R., Kuo, T., Lee, O., Wei, Y.-H.** (2008) Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:960–968.
- Chen, Z., Gibson, T., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.** (2001) MAP Kinases. *Chem Rev* 101:2449–2476.
- Cheng, S., Yang, J., Rifas, L., Zhang, S., Avioli, L.** (1994) Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134:277–286.
- Chesher, G., Jackson, D., Malor, R.** (1975) Interaction of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol with phenobarbitone in protecting mice from electrically induced convulsions. *J Pharm Pharmacol* 27:608–609.
- Choi, H., Kim, J., Kwon, E., Che, J.-H., Lee, J.-I., Cho, S.-R., Kang, S., Ra, J., Kang, B.-C.** (2011) Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci* 26:482–491.
- Choi, K.-M., Seo, Y.-K., Yoon, H.-H., Song, K.-Y., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., Park, J.-K.** (2008) Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng* 105:586–594.
- Chung, C., Golub, E., Forbes, E., Tokuoka, T., Shapiro, I.** (1992) Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51:305–311.
- Cleland, W., Hengge, A.** (2006) Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer. *Chem Rev* 106:3252–3278.
- Compagnucci, C., Di Siena, S., Bustamante, M., Di Giacomo, D., Di Tommaso, M., Maccarrone, M., Grimaldi, P., Sette, C.** (2013) Type-1 (CB1) cannabinoid receptor promotes neuronal differentiation and maturation of neural stem cells. *PLoS One* 8:e54271.
- Consroe, P., Kennedy, K., Schram, K.** (1991) Assay of plasma cannabidiol by capillary gas chromatography/ion trap mass spectroscopy following high-dose repeated daily oral administration in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 40:517–522.
- Costa, B.** (2007) On the pharmacological properties of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem Biodivers* 4:1664–1677.

- Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A., Colleoni, M.** (2004) Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 143:247–250.
- Dalton, W., Martz, R., Lemberger, L., Rodda, B., Forney, R.** (1976) Influence of cannabidiol on delta-9-tetrahydrocannabinol effects. *Clin Pharmacol Ther* 19:300–309.
- Davies, S., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P.** (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95–105.
- Demuth, D., Molleman, A.** (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549–563.
- Devane, W., Dysarz, F., Johnson, M., Melvin, L., Howlett, A.** (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605–613.
- Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R.** (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946–1949.
- Do Monte, F., Souza, R., Bitencourt, R., Kroon, J., Takahashi, R.** (2013) Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav Brain Res* 250:23–27.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.** (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- Dudley, D., Pang, L., Decker, S., Bridges, A., Saltiel, A.** (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686–7689.
- Felder, C., Joyce, K., Briley, E., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A., Mitchell, R.** (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48:443–450.
- Fey, D., Croucher, D., Kolch, W., Kholodenko, B.** (2012) Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol* 3:355.
- Filippis, D. de, Iuvone, T., D'Amico, A., Esposito, G., Steardo, L., Herman, A., Pelckmans, P., Winter, B. de, Man, J. de** (2008) Effect of cannabidiol on sepsis-induced motility disturbances in mice: involvement of CB1 receptors and fatty acid amide hydrolase. *Neurogastroenterol Motil* 20:919–927.
- Fink, T., Lund, P., Pilgaard, L., Rasmussen, J., Duroux, M., Zachar, V.** (2008) Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure. *BMC Mol Biol* 9:98.
- Fisar, Z.** (2009) Phytocannabinoids and Endocannabinoids. *Curr Drug Abuse Rev* 2:51–75.
- Fong, C.-Y., Gauthaman, K., Bongso, A.** (2010) Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem* 111:769–781.
- Fong, E., Chan, C., Goodman, S.** (2011) Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials* 32:395–409.
- Ford, L., Roelofs, A., Anavi-Goffer, S., Mowat, L., Simpson, D., Irving, A., Rogers, M., Rajnicek, A., Ross, R.** (2010) A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 160:762–771.
- Fraga, D., Raborn, E., Ferreira, G., Cabral, G.** (2011) Cannabinoids inhibit migration of microglial-like cells to the HIV protein Tat. *J Neuroimmune Pharmacol* 6:566–577.
- Franklin, A., Stella, N.** (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol* 474:195–198.
- Freimuth, N., Ramer, R., Hinz, B.** (2010) Antitumorigenic Effects of Cannabinoids beyond Apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 332:336–344.
- Friedenstein, A., Chailakhjan, R., Lalykina, K.** (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393–403.

- Friedenstein, A., Chailakhyan, R., Latsinik, N., Panasyuk, A., Keiliss-Borok, I.** (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation* 17:331–340.
- Fuchs, H., Sabrautski, S., Seedorf, H., Rathkolb, B., Rozman, J., Hans, W., Schneider, R., Klatfen, M., Holter, S., Becker, L. et al.** (2012) Does enamel have pleiotropic effects on organs other than the teeth? Lessons from a phenotyping screen of two enamel-mutant mouse lines. *Eur J Oral Sci* 120:269–277.
- Gaffuri, A.-L., Ladarre, D., Lenkei, Z.** (2012) Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology* 90:19–39.
- Gao, X., Lowry, P., Zhou, X., Depry, C., Wei, Z., Wong, G., Zhang, J.** (2011) PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *PNAS* 108:14509–14514.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R.** (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 86:1646–1647.
- Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., Reiner, O.** (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J* 23:823–832.
- Gentile, P., Orlandi, A., Scioli, M., Di Pasquali, C., Bocchini, I., Cervelli, V.** (2012) Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem Cells Transl Med* 1:230–236.
- Gentilini, D., Besana, A., Vigano, P., Dalino, P., Vignali, M., Melandri, M., Busacca, M., Di Blasio, A.** (2010) Endocannabinoid system regulates migration of endometrial stromal cells via cannabinoid receptor 1 through the activation of PI3K and ERK1/2 pathways. *Fertil Steril* 93:2588–2593.
- George, K., Saltman, L., Stein, G., Lian, J., Zurier, R.** (2008) Ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid acid, suppresses osteoclastogenesis in mononuclear precursor cells and induces apoptosis in mature osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* 214:714–720.
- Gerber, H., Vu, T., Ryan, A., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N.** (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623–628.
- Gillies, R., Didier, N., Denton, M.** (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159:109–113.
- Gimble, J., Katz, A., Bunnell, B.** (2007) Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* 100:1249–1260.
- Gitelman, H.** (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* 18:521–531.
- Giuliano, M., Calvaruso, G., Pellerito, O., Portanova, P., Carlisi, D., Vento, R., Tesoriere, G.** (2006) Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway. *Int J Mol Med* 17:811–819.
- Golub, E., Boesze-Battaglia, K.** (2007) The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* 18:444–448.
- Gowran, A., McKay, K., Campbell, V.** (2013) The cannabinoid receptor type 1 is essential for mesenchymal stem cell survival and differentiation: implications for bone health. *Stem Cells Int* 2013:796715.
- Granero-Moltó, F., Weis, J., Miga, M., Landis, B., Myers, T., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E., Mortlock, D., Spagnoli, A.** (2009) Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. *Stem Cells* 27:1887–1898.
- Greenshaw, A.** (1993) Behavioural pharmacology of 5-HT₃ receptor antagonists: a critical update on therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 14:265–270.
- Gregory, C., Grady Gunn, W., Peister, A., Prockop, D.** (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 329:77–84.

- Gutierrez, J., Cabrera, D., Brandan, E.** (2014) Glypican-1 regulates myoblast response to HGF via Met in a lipid raft-dependent mechanism: effect on migration of skeletal muscle precursor cells. *Skelet Muscle* 4:5.
- Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häußler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., Linder, R.** (2013) The Epidemiology of Osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): An Analysis of Routine Health Insurance Data. *Dtsch Arztebl Int* 110:52–57.
- Hamelink, C., Hampson, A., Wink, D., Eiden, L., Eskay, R.** (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 314:780–788.
- Hayashi, S., Nakamura, E., Endo, T., Kubo, Y., Takeuchi, K.** (2007) Impairment by activation of TRPA1 of gastric epithelial restitution in a wound model using RGM1 cell monolayer. *Inflammopharmacology* 15:218–222.
- Hedges, J., Dechert, M., Yamboliev, I., Martin, J., Hickey, E., Weber, L., Gerthoffer, W.** (1999) A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 274:24211–24219.
- Henstridge, C., Balenga, N., Ford, L., Ross, R., Waldhoer, M., Irving, A.** (2008) The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J* 23:183–193.
- Henstridge, C., Balenga, N., Kargl, J., Andradas, C., Brown, A., Irving, A., Sánchez, C., Waldhoer, M.** (2011) Minireview: Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55. *Mol Endocrinol* 25:1835–1848.
- Hoemann, C., El-Gabalawy, H., McKee, M.** (2009) In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)* 57:318–323.
- Horwitz, E., Prockop, D., Fitzpatrick, L., Koo, W., Gordon, P., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J., Pyeritz, R. et al.** (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5:309–313.
- Hou, L.-T., Li, T.-I., Liu, C.-M., Liu, B.-Y., Liu, C.-L., Mi, H.-W.** (2007) Modulation of osteogenic potential by recombinant human bone morphogenic protein-2 in human periodontal ligament cells: effect of serum, culture medium, and osteoinductive medium. *J Periodontal Res* 42:244–252.
- Howlett, A., Barth, F., Bonner, T., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W., Felder, C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. et al.** (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161–202.
- Hsu, S.-H., Chen, C.-T., Wei, Y.-H.** (2013) Inhibitory Effects of Hypoxia on Metabolic Switch and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 31:2779–2788.
- Huang, C., Jacobson, K., Schaller, M.** (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117:4619–4628.
- Huang, J., Zhang, Z., Guo, J., Ni, A., Deb, A., Zhang, L., Mirotso, M., Pratt, R., Dzau, V.** (2010) Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res* 106:1753–1762.
- Huang, L., Ramirez, J., Frampton, G., Golden, L., Quinn, M., Pae, H., Horvat, D., Liang, L.-j., Demorrow, S.** (2011) Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. *Lab Invest* 91:1007–1017.
- Huh, J.-E., Lee, S.** (2013) IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1833:2608–2616.
- Hunger-Glaser, I., Perez Salazar, E., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E.** (2003) Bombesin, Lysophosphatidic Acid, and Epidermal Growth Factor Rapidly Stimulate Focal Adhesion Kinase Phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 278:22631–22643.

- Idris, A.** (2010) Cannabinoid Receptors as Target for Treatment of Osteoporosis: A Tale of Two Therapies. *Curr Neuropharmacol* 8:243–253.
- Idris, A.** (2011) The promise and dilemma of cannabinoid therapy: Lessons from animal studies of bone disease. *IBMS BoneKEy* 8:84–95.
- Idris, A., Landao-Bassonga, E., Ralston, S.** (2010) The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone* 46:1089–1099.
- Idris, A., Ralston, S.** (2012) Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. *Front Endocrinol* 3:1–8.
- Idris, A., van't Hof, R., Greig, I., Ridge, S., Baker, D., Ross, R., Ralston, S.** (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med* 11:774–779.
- Izzo, A., Borrelli, F., Capasso, R., Marzo, V. Di, Mechoulam, R.** (2009) Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 30:515–527.
- Izzo, A., Camilleri, M.** (2009) Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res* 60:117–125.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S., Caplan, A., Bruder, S.** (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295–312.
- Jarai, Z., Wagner, J., Varga, K., Lake, K., Compton, D., Martin, B., Zimmer, A., Bonner, T., Buckley, N., Mezey, E. et al.** (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14136–14141.
- Jarrahian, A., Watts, V., Barker, E.** (2004) D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 308:880–886.
- Jiang, Q., Zhou, C., Bi, Z., Wan, Y.** (2006) EGF-Induced Cell Migration Is Mediated by ERK and PI3K/AKT Pathways in Cultured Human Lens Epithelial Cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 22:93–102.
- Jiang, S., Fu, Y., Williams, J., Wood, J., Pandarinathan, L., Avraham, S., Makriyannis, A., Avraham, S., Avraham, H., Zwaka, T.** (2007) Expression and Function of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 and Their Cognate Cannabinoid Ligands in Murine Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 2:e641.
- Jo, M., Thomas, K., Somlyo, A., Somlyo, A., Gonias, S.** (2002) Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho kinase pathways in urokinase-type plasminogen activator-stimulated cell migration. *J Biol Chem* 277:12479–12485.
- Johnson, G., Lapadat, R.** (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinases. *Science* 298:1911–1912.
- Jones, D., Wagers, A.** (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:11–21.
- Jurgens, W., Oedayrajsingh-Varma, M., Helder, M., ZandiehDoulabi, B., Schouten, T., Kuik, D., Ritt, M., Milligen, F.** (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 332:415–426.
- Kanazawa, S., Fujiwara, T., Matsuzaki, S., Shingaki, K., Taniguchi, M., Miyata, S., Tohyama, M., Sakai, Y., Yano, K., Hosokawa, K. et al.** (2010) bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS One* 5:e12228.
- Kang, Y., Jeon, E., Song, H., Woo, J., Jung, J., Kim, Y., Kim, J.** (2005) Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 95:1135–1145.
- Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M., Barak, L., Abood, M.** (2009) Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *J Biol Chem* 284:29817–29827.

- Karschner, E., Darwin, W., Goodwin, R., Wright, S., Huestis, M. (2011) Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin Chem* 57:66–75.
- Kessler, G., Wolfman, M. (1964) An automated procedure for the simultaneous determination of calcium and phosphorus. *Clin Chem* 10:686–703.
- Khosla, S., Westendorf, J., Oursler, M. (2008) Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 118:421–428.
- Kishimoto, S., Gokoh, M., Oka, S., Muramatsu, M., Kajiwar, T., Waku, K., Sugiura, T. (2003) 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278:24469–24475.
- Klemke, R., Cai, S., Giannini, A., Gallagher, P., Lanerolle, P. de, Cheres, D. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137:481–492.
- Kozono, S., Matsuyama, T., Biwasa, K., Kawahara, K.-i., Nakajima, Y., Yoshimoto, T., Yonamine, Y., Kadomatsu, H., Tanchaen, S., Hashiguchi, T. et al. (2010) Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing. *Biochem Biophys Res Commun* 394:928–933.
- Kurihara, R., Tohyama, Y., Matsusaka, S., Naruse, H., Kinoshita, E., Tsujioka, T., Katsumata, Y., Yamamura, H. (2006) Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem* 281:12908–12918.
- Kutyavin, I., Afonina, I., Mills, A., Gorn, V., Lukhtanov, E., Belousov, E., Singer, M., Walburger, D., Lokhov, S., Gall, A. et al. (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28:655–661.
- Kyriakis, J., Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807–869.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lam, P. (2005) Characterization and comparison of recombinant human and rat TRPV1 receptors: effects of exo- and endocannabinoids. *Br J Anaesth* 94:649–656.
- Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J., Mechoulam, R., Fernandez-Ruiz, J. (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19:96–107.
- Lauckner, J., Jensen, J., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., Mackie, K. (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2699–2704.
- Lazarus, H., Koc, O., Devine, S., Curtin, P., Maziarz, R., Holland, H., Shpall, E., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B. et al. (2005) Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:389–398.
- Leelawat, S., Leelawat, K., Narong, S., Matangkasombut, O. (2010) The dual effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol on cholangiocarcinoma cells: anti-invasion activity at low concentration and apoptosis induction at high concentration. *Cancer Invest* 28:357–363.
- Li, S., Zhai, Q., Zou, D., Meng, H., Xie, Z., Li, C., Wang, Y., Qi, J., Cheng, T., Qiu, L. (2013) A pivotal role of bone remodeling in granulocyte colony stimulating factor induced hematopoietic stem/progenitor cells mobilization. *J Cell Physiol* 228:1002–1009.
- Li, Y., Chen, J., Zhang, C., Wang, L., Lu, D., Katakowski, M., Gao, Q., Shen, L., Zhang, J., Lu, M. et al. (2005) Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49:407–417.
- Li, Y., Wang, J.-P., Santen, R., Kim, T.-H., Park, H., Fan, P., Yue, W. (2010) Estrogen Stimulation of Cell Migration Involves Multiple Signaling Pathway Interactions. *Endocrinology* 151:5146–5156.

- Lieder, R., Sigurjonsson, O.** (2014) The Effect of Recombinant Human Interleukin-6 on Osteogenic Differentiation and YKL-40 Expression in Human, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Biores Open Access* 3:29–34.
- Ligresti, A., Moriello, A., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., Petrocellis, L. de, Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., Di Marzo, V.** (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1375–1387.
- Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Banie, L., Guo, Y.-L., Lue, T., Lin, C.-S.** (2008) Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells Dev* 17:1053–1063.
- Liu, D., He, X., Wang, K., He, C., Shi, H., Jian, L.** (2010) Biocompatible Silica Nanoparticles–Insulin Conjugates for Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation. *Bioconjugate Chem.* 21:1673–1684.
- Liu, D.-D., Ge, K., Jin, Y., Sun, J., Wang, S.-X., Yang, M.-S., Zhang, J.-C.** (2014) Terbium promotes adhesion and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via activation of the Smad-dependent TGF-beta/BMP signaling pathway. *J Biol Inorg Chem.*
- Liu, Q., Wang, X.** (2013) Effect of TRPV2 cation channels on the proliferation, migration and invasion of 5637 bladder cancer cells. *Exp Ther Med* 6:1277–1282.
- Liu, Q.-R., Pan, C.-H., Hishimoto, A., Li, C.-Y., Xi, Z.-X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M.-P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E. et al.** (2009a) Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav* 8:519–530.
- Liu, Z.-J., Zhuge, Y., Velazquez, O.** (2009b) Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106:984–991.
- Livak, K., Schmittgen, T.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Lo, H.-M., Shieh, J.-M., Chen, C.-L., Tsou, C.-J., Wu, W.-B.** (2013) Vascular Endothelial Growth Factor Induces CXCL1 Chemokine Release via JNK and PI-3K-Dependent Pathways in Human Lung Carcinoma Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 14:10090–10106.
- Mackie, K.** (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286:S60.
- MacLennan, S.J., Reynen, P.H., Kwan, J., Bonhaus, D.W. and Martin, G.R.** (1998) [³⁵S]GTPγS binding to assess inverse agonist actions of ligands at human recombinant CB1 and CB2 receptors. *Symposium on the Cannabinoids*. Burlington, Vermont, USA. International Cannabinoid Research Society. p 7.
- Madrid, J., Gutierrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Arguelles, H., Diaz-Flores, L.** (2006) Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol* 21:995–1027.
- Malfait, A., Gallily, R., Sumariwalla, P., Malik, A., Andreaskos, E., Mechoulam, R., Feldmann, M.** (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9561–9566.
- Malladi, P., Xu, Y., Chiou, M., Giaccia, A., Longaker, M.** (2006) Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1139–46.
- Manolagas, S.** (2000) Birth and Death of bone cells: Basic Mechanism and Implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115–137.
- Mansilla, E., Marin, G., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., Lamonega, R., Guzman, A., Nunez, A. et al.** (2006) Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc* 38:967–969.
- Marie, P., Kassem, M.** (2011) Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol* 165:1–10.
- Martin, E., Dahan, D., Cardouat, G., Gillibert-Duplantier, J., Marthan, R., Savineau, J.-P., Ducret, T.** (2012) Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 464:261–272.

- Martin-Moreno, A., Reigada, D., Ramirez, B., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., Ceballos, M. de** (2011) Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79:964–973.
- Marzo, V. Di** (2006) A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci* 27:134–140.
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M., Parolaro, D.** (2004) Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308:838–845.
- Massi, P., Valenti, M., Vaccani, A., Gasperi, V., Perletti, G., Marras, E., Fezza, F., Maccarrone, M., Parolaro, D.** (2008) 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem* 104:1091–1100.
- Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Aburatani, H., Nishimura, R., Yoneda, T.** (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283:29119–29125.
- Matsuda, L., Lolait, S., Brownstein, M., Young, A., Bonner, T.** (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564.
- Matsumoto, T., Kuriwaka-Kido, R., Kondo, T., Endo, I., Kido, S.** (2012) Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J* 59:91–101.
- McHugh, D., Page, J., Dunn, E., Bradshaw, H.** (2012) Delta(9) -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol* 165:2414–2424.
- McHugh, D., Tanner, C., Mechoulam, R., Pertwee, R., Ross, R.** (2008) Inhibition of Human Neutrophil Chemotaxis by Endogenous Cannabinoids and Phytocannabinoids: Evidence for a Site Distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol* 73:441–450.
- McNeilly, T., McNally, C., Finch, M., Beringer, T.** (2013) Recombinant PTH: a study of the outcome of teriparatide therapy for 138 patients with osteoporosis. *Ulster Med J* 82:89–93.
- Mecha, M., Torrao, A., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F., Mechoulam, R., Guaza, C.** (2012) Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis* 3:e331.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N., Schatz, A., Gopher, A., Almog, S., Martin, B., Compton, D.** (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83–90.
- Mechoulam, R., Parker, L., Gallily, R.** (2002) Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* 42:11S–19S.
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.** (2007) Cannabidiol - recent advances. *Chem Biodivers* 4:1678–1692.
- Meyer, C., Liu, Y., Kaul, A., Peipe, I., Dooley, S.** (2013) Caveolin-1 abrogates TGF- β mediated hepatocyte apoptosis. *Cell Death Dis* 4:e466.
- Minutoli, L., Altavilla, D., Marini, H., Passaniti, M., Bitto, A., Seminara, P., Venuti, F., Famulari, C., Macri, A., Versaci, A. et al.** (2004) Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sci* 75:2853–2866.
- Mitra, S., Hanson, D., Schlaepfer, D.** (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:56–68.
- Mizuno, H., Tobita, M., Uysal, A.** (2012) Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30:804–810.
- Moissoglu, K., Schwartz, M.** (2006) Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* 98:547–555.

- Montalibet, J., Skorey, K., Kennedy, B.** (2005) Protein tyrosine phosphatase: enzymatic assays. *Methods* 35:2–8.
- Moreno-Navarrete, J., Catalan, V., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Vazquez-Martinez, R., Rotellar, F., Guzman, R., Gomez-Ambrosi, J., Pulido, M., Russell, W. et al.** (2012) The L-alpha-lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61:281–291.
- Moroni, L., Fornasari, P.** (2013) Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol* 228:680–687.
- Munro, S., Thomas, K., Abu-Shaar, M.** (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65.
- Napimoga, M., Benatti, B., Lima, F., Alves, P., Campos, A., Pena-dos-Santos, D., Severino, F., Cunha, F., Guimarães, F.** (2009) Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int Immunopharmacol* 9:216–222.
- Neer, R., Arnaud, C., Zanchetta, J., Prince, R., Gaich, G., Reginster, J., Hodsman, A., Eriksen, E., Ish-Shalom, S., Genant, H. et al.** (2001) Effect of parathyroid hormone (1–34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434–1441.
- Nithipatikom, K., Gomez-Granados, A., Tang, A., Pfeiffer, A., Williams, C., Campbell, W.** (2012) Cannabinoid receptor type 1 (CB1) activation inhibits small GTPase RhoA activity and regulates motility of prostate carcinoma cells. *Endocrinology* 153:29–41.
- Oedayrajsingh-Varma, M., van Ham, S., Knippenberg, M., Helder, M., Klein-Nulend, J., Schouten, T., Ritt, M., van Milligen, F.** (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8:166–177.
- Oesch, S., Gertsch, J.** (2009) Cannabinoid receptor ligands as potential anticancer agents – high hopes for new therapies? *J Pharm Pharmacol* 61:839–853.
- Ofek, O., Karsak, M., Leclerc, F., Frenkel, B., Wright, K., Tam, J., Attar-Namdar, M., Kram, V., Shohami, E., Mechoulam, R. et al.** (2006) Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:696–701.
- Oka, S., Ikeda, S., Kishimoto, S., Gokoh, M., Yanagimoto, S., Waku, K., Sugiura, T.** (2004) 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J Leukoc Biol* 76:1002–1009.
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T.** (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 362:928–934.
- Orimo, H.** (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77:4–12.
- O'Sullivan, S., Kendall, D.** (2010) Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215:611–616.
- Oudin, M., Gajendra, S., Williams, G., Hobbs, C., Lalli, G., Doherty, P.** (2011) Endocannabinoids regulate the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci* 31:4000–4011.
- Oulidi, A., Bokhobza, A., Gkika, D., Vanden Abeele, F., Lehen'kyi, V., Ouafik, L., Mauroy, B., Prevarskaya, N.** (2013) TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion. *PLoS One* 8:e64885.
- Pacifici, R.** (2008) Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol* 252:68–80.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., Galve-Roperh, I.** (2006) Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 20:2405–2407.

- Parker, L., Kwiatkowska, M., Mechoulam, R.** (2006) Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol, but not ondansetron, interfere with conditioned retching reactions elicited by a lithium-paired context in *Suncus murinus*: An animal model of anticipatory nausea and vomiting. *Physiol Behav* 87:66–71.
- Peng, H., Wright, V., Usas, A., Gearhart, B., Shen, H.-C., Cummins, J., Huard, J.** (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110:751–759.
- Pertwee, R.** Cannabinoid Receptor Ligands. *TOCRIS*.
- Pertwee, R.** (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids- delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 153:199–215.
- Pertwee, R., Ross, R.** (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:101–121.
- Petrocellis, L. de, Marzo, V. Di** (2009) Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca^{2+} signalling. *Cell Calcium* 45:611–624.
- Pickens, J.** (1981) Sedative activity of cannabis in relation to its delta'-trans-tetrahydrocannabinol and cannabidiol content. *Br J Pharmacol* 72:649–656.
- Pollak, N., Dölle, C., Ziegler, M.** (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.* 402:205.
- Pountos, I., Georgouli, T., Henshaw, K., Bird, H., Jones, E., Giannoudis, P.** (2010) The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. *J Orthop Trauma* 24:552–556.
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P. et al.** (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129:118–129.
- Qian, H., Zhao, Y., Peng, Y., Han, C., Li, S., Huo, N., Ding, Y., Duan, Y., Xiong, L., Sang, H.** (2010) Activation of cannabinoid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 45:504–511.
- Raborn, E., Cabral, G.** (2010) Cannabinoid inhibition of macrophage migration to the trans-activating (Tat) protein of HIV-1 is linked to the CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 333:319–327.
- Ramer, R., Bublitz, K., Freimuth, N., Merkord, J., Rohde, H., Haustein, M., Borchert, P., Schmuhl, E., Linnebacher, M., Hinz, B.** (2012) Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J* 26:1535–1548.
- Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., Hinz, B.** (2013) COX-2 and PPAR-gamma confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 12:69–82.
- Ramer, R., Hinz, B.** (2010) Cyclooxygenase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 confer the antimigratory effect of cannabinoids on human trabecular meshwork cells. *Biochem Pharmacol* 80:846–857.
- Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., Hinz, B.** (2010) Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol* 79:955–966.
- Rehman, J.** (2010) Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med (Berl)* 88:981–986.
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., Shi, Y.** (2012) Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues. *Stem Cells Transl Med* 1:51–58.
- Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M., Vitoretti, L., Mariano-Souza, D., Quinteiro-Filho, W., Akamine, A., Almeida, V., Quevedo, J., Dal-Pizzol, F. et al.** (2012) Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a

- murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 678:78–85.
- Ridley, A.** (2003) Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302:1704–1709.
- Roodman, G.** (1999) Cell biology of osteoclast. *Exp Hematol* 27:1229–1241.
- Ross, R.** (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 30:156–163.
- Rossi, F., Bernardo, M., Bellini, G., Luongo, L., Conforti, A., Manzo, I., Guida, F., Cristino, L., Imperatore, R., Petrosino, S. et al.** (2013) The cannabinoid receptor type 2 as mediator of mesenchymal stromal cell immunosuppressive properties. *PLoS One* 8:e80022.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.** (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092–1101.
- Sagredo, O., Ramos, J., Decio, A., Mechoulam, R., Fernandez-Ruiz, J.** (2007) Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *Eur J Neurosci* 26:843–851.
- Salh, B., Martens, J., Hundal, R., Yoganathan, N., Charest, D., Mui, A., Gomez-Munoz, A.** (2000) PD98059 attenuates hydrogen peroxide-induced cell death through inhibition of Jun N-Terminal Kinase in HT29 cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:158–165.
- Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H., Kuroda, S.** (2008) Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci* 108:18–31.
- Sarkar, B., Chauhan, U.** (1967) A new method for determining micro quantities of calcium in biological materials. *Anal Biochem* 20:155–166.
- Sarker, K., Maruyama, I.** (2003) Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* 60:1200–1208.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S. et al.** (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24:391–395.
- Satokata, I., Maas, R.** (1994) Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6:348–356.
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D., Lynch, K., Cheng, R., Heng, H., George, S., O'Dowd, B.** (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64:193–198.
- Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H.-M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., Bradshaw, H. et al.** (2011) The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm Bowel Dis* 17:1651–1664.
- Schilling, T., Eder, C.** (2009) Non-selective cation channel activity is required for lysophosphatidylcholine-induced monocyte migration. *J Cell Physiol* 221:325–334.
- Schofield, R.** (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7–25.
- Scutt, A., Williamson, E.** (2007) Cannabinoids Stimulate Fibroblastic Colony Formation by Bone Marrow Cells Indirectly via CB2 Receptors. *Calcif Tissue Int* 80:50–59.
- Seong, J., Kim, B.-C., Park, J.-H., Kwon, I., Mantalaris, A., Hwang, Y.-S.** (2010) Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 5:1–15.
- Sharir, H., Abood, M.** (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther* 126:301–313.
- Shimizu, T., Tanaka, T., Iso, T., Matsui, H., Ooyama, Y., Kawai-Kowase, K., Arai, M., Kurabayashi, M.** (2011) Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein

- 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 286:19138–19148.
- Shoji, T., Ii, M., Mifune, Y., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kwon, S.-M., Kuroda, T., Kuroda, R., Kurosaka, M., Asahara, T.** (2010) Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 90:637–649.
- Showalter, V., Compton, D., Martin, B., Abood, M.** (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 278:989–999.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.
- Solinas, M., Massi, P., Cantelmo, A., Cattaneo, M., Cammarota, R., Bartolini, D., Cinquina, V., Valenti, M., Vicentini, L., Noonan, D. et al.** (2012) Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *Br J Pharmacol* 167:1218–1231.
- Sophocleous, A., Landao-Bassonga, E., van't Hof, R., Idris, A., Ralston, S.** (2011) The Type 2 Cannabinoid Receptor Regulates Bone Mass and Ovariectomy-Induced Bone Loss by Affecting Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Endocrinology* 152:2141–2149.
- Stanley, C., Hind, W., O'Sullivan, S.** (2013) Is the cardiovascular system a therapeutic target for cannabidiol? *Br J Clin Pharmacol* 75:313–322.
- Staton, P., Hatcher, J., Walker, D., Morrison, A., Shapland, E., Hughes, J., Chong, E., Mander, P., Green, P., Billinton, A. et al.** (2008) The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139:225–236.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., Kassem, M.** (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33:919–926.
- Storlazzi, C., Wozniak, A., Panagopoulos, I., Sciort, R., Mandahl, N., Mertens, F., Debiec-Rychter, M.** (2006) Rearrangement of the COL12A1 and COL4A5 genes in subungual exostosis: molecular cytogenetic delineation of the tumor-specific translocation t(X;6)(q13-14;q22). *Int J Cancer* 118:1972–1976.
- Strem, B., Hicok, K., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R., Fraser, J., Hedrick, M.** (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132–141.
- Su, F., Li, H., Yan, C., Jia, B., Zhang, Y., Chen, X.** (2009) Depleting MEKK1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human pancreatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 135:1655–1663.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K.** (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89–97.
- Tam, J., Trembovler, V., Di Marzo, V., Petrosino, S., Leo, G., Alexandrovich, A., Regev, E., Casap, N., Shteyer, A., Ledent, C. et al.** (2008) The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J* 22:285–294.
- Tanemura, S., Momose, H., Shimizu, N., Kitagawa, D., Seo, J., Yamasaki, T., Nakagawa, K., Kajiho, H., Penninger, J., Katada, T. et al.** (2009) Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *J Biochem* 145:345–354.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B. de, Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E.** (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291–295.
- Thomas, A., Baillie, G., Phillips, A., Razdan, R., Ross, R., Pertwee, R.** (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150:613–623.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354.
- Traktuev, D., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., Johnstone, B., March, K.** (2008) A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 102:77–85.
- Tuncay, O., Ho, D., Barker, M.** (1994) Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105:457–463.
- Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V.** (2006) Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36:2566–2573.
- Vaccani, A., Massi, P., Colombo, A., Rubino, T., Parolaro, D.** (2005) Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 144:1032–1036.
- Vandesompele, J., Preter, K. de, Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., Paepe, A. de, Speleman, F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:research0034.1.
- Viereck, V., Siggelkow, H., Tauber, S., Raddatz, D., Schutze, N., Hufner, M.** (2002) Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem* 86:348–356.
- Vlahos, C., Matter, W., Hui, K., Brown, R.** (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241–5248.
- Wada, T., McKee, M., Steitz, S., Giachelli, C.** (1999) Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 84:166–178.
- Waetzig, V., Herdegen, T.** (2005) MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling. *Mol Cell Neurosci* 30:67–78.
- Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., Graier, W.** (2008) Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 121:1704–1717.
- Walker, E., Pacold, M., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P., Wymann, M., Williams, R.** (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 6:909–919.
- Walker, J., Zhai, N., Zhang, L., Bleaken, B., Wolff, I., Gerhart, J., George-Weinstein, M., Menko, A.** (2010) Unique precursors for the mesenchymal cells involved in injury response and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13730–13735.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., Stella, N.** (2003) Nonpsychotropic Cannabinoid Receptors Regulate Microglial Cell Migration. *J Neurosci* 23:1398–1405.
- Wang, Y., Singh, A., Xu, P., Pindrus, M., Blasioli, D., Kaplan, D.** (2006) Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer. *Biomaterials* 27:3265–3273.
- Wang, Z., Yang, H., Zhang, F., Pan, Z., Capo-Aponte, J., Reinach, P.** (2009) Dependence of EGF-Induced Increases in Corneal Epithelial Proliferation and Migration on GSK-3 Inactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4828–4835.
- Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stüwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippiat, C., Nilius, B., Schwab, A.** (2007) A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: Involvement in cell migration. *Cell Calcium* 42:17–25.
- Webb, D., Nguyen, D., Gonias, S.** (2000) Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci* 113 (Pt 1):123–134.

- Wei, L., Liu, Y., Kaneto, H., Fanburg, B.** (2010) JNK regulates serotonin-mediated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:L863-9.
- Whyte, L., Ryberg, E., Sims, N., Ridge, S., Mackie, K., Greasley, P., Ross, R., Rogers, M.** (2009a) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. Supporting information. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16511–16516.
- Whyte, L., Ryberg, E., Sims, N., Ridge, S., Mackie, K., Greasley, P., Ross, R., Rogers, M.** (2009b) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16511–16516.
- Witowsky, J., Johnson, G.** (2003) Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem* 278:1403–1406.
- Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., Ward, S.** (2005) Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129:437–453.
- Wrocklage, C., Wassmann, H., Paulus, W.** (2000) COL9A2 allelotypes in intervertebral disc disease. *Biochem Biophys Res Commun* 279:398–400.
- Xie, H., Sun, X., Piao, Y., Jegga, A., Handwerger, S., Ko, M., Dey, S.** (2012) Silencing or amplification of endocannabinoid signaling in blastocysts via CB1 compromises trophoblast cell migration. *J Biol Chem* 287:32288–32297.
- Yang, H., Wang, Z., Capo-Aponte, J., Zhang, F., Pan, Z., Reinach, P.** (2010) Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 91:462–471.
- Yao, W., Guan, M., Jia, J., Dai, W., Lay, Y.-A., Amugongo, S., Liu, R., Olivos, D., Saunders, M., Lam, K. et al.** (2013) Reversing bone loss by directing mesenchymal stem cells to bone. *Stem Cells* 31:2003–2014.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I. et al.** (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208:64–76.
- Yu, J., Vodyanik, M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G., Ruotti, V., Stewart, R. et al.** (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318:1917–1920.
- Yu, T.-S., Cheng, Z.-H., Li, L.-Q., Zhao, R., Fan, Y.-Y., Du, Y., Ma, W.-X., Guan, D.-W.** (2010) The cannabinoid receptor type 2 is time-dependently expressed during skeletal muscle wound healing in rats. *Int J Legal Med* 124:397–404.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G., Johnson, G.** (1998) Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282:1911–1914.
- Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkentin, J., Zheng, Y., Xia, Y.** (2005) MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* 25:60–65.
- Zhang, L., Yan Liu, D., Ma, L., Luo, Z., Cao, T., Zhong, J., Yan, Z., Wang, L., Zhao, Z., Zhu, S. et al.** (2007) Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res* 100:1063–1070.
- Zhang, W., Zhu, C., Wu, Y., Ye, D., Wang, S., Zou, D., Zhang, X., Kaplan, D., Jiang, X.** (2014) VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cell Mater* 27:1–12.
- Zhang, X., Maor, Y., Wang, J., Kunos, G., Groopman, J.** (2010) Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br J Pharmacol* 160:1583–1594.
- Zhou, S., Bueno, E., Kim, S., Amato, I., Shen, L., Hahne, J., Bleiberg, I., Morley, P., Glowacki, J.** (2011) Effects of age on parathyroid hormone signaling in human marrow stromal cells. *Aging Cell* 10:780–788.

- Zimmerlin, L., Donnenberg, V., Rubin, J., Donnenberg, A.** (2013) Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 83:134–140.
- Zuardi, A., Morais, S., Guimarães, F., Mechoulam, R.** (1995) Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry* 56:485–486.
- Zuardi, A., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., Karniol, I.** (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 76:245–250.
- Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., Ugarte, D. de, Huang, J., Mizuno, H., Alfonso, Z., Fraser, J., Benhaim, P., Hedrick, M.** (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295.
- Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J., Katz, A., Benhaim, P., Lorenz, H., Hedrick, M.** (2001) Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng* 7:211–228.

Anhang

Tabelle 14: TaqMan® Array Plate_Human Osteogenesis - Plattenbelegung

Well	Gen - Symbol	kompletter Name
A01	18S	Eukaryotic 18S rRNA (house keeping gene; HKG)
A02	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HKG)
A03	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HKG)
A04	GUSB	glucuronidase, beta (HKG)
A05	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein
A06	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
A07	AMBN	ameloblastin (enamel matrix protein)
A08	AMELY	amelogenin, Y-linked
A09	ARSE	arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)
A10	BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
A11	BMP1	bone morphogenetic protein 1
A12	BMP2	bone morphogenetic protein 2
B01	BMP3	bone morphogenetic protein 3
B02	BMP4	bone morphogenetic protein 4
B03	BMP5	bone morphogenetic protein 5
B04	BMP6	bone morphogenetic protein 6
B05	BMP7	bone morphogenetic protein 7
B06	BMPR1A	bone morphogenetic protein receptor, type IA
B07	CALCR	calcitonin receptor
B08	CASR	Kalzium-sensing receptor
B09	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
B10	COL10A1	collagen, type X, alpha 1
B11	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
B12	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1
C01	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1
C02	COL15A1	collagen, type XV, alpha 1
C03	COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1
C04	COL17A1	collagen, type XVII, alpha 1
C05	COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1
C06	COL19A1	collagen, type XIX, alpha 1
C07	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
C08	COL1A2	collagen, type I, alpha 2
C09	COL2A1	collagen, type II, alpha 1
C10	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
C11	COL4A3	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
C12	COL4A4	collagen, type IV, alpha 4
D01	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5
D02	COL5A1	collagen, type V, alpha 1
D03	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1
D04	COL9A2	collagen, type IX, alpha 2
D05	COMP	cartilage oligomeric matrix protein
D06	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
D07	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
D08	DMP1	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
D09	EGF	epidermal growth factor (beta-urogastrone)
D10	EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
D11	ENAM	enamelin

Well	Gen - Symbol	kompletter Name
D12	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)
E01	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
E02	FGF3	fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2) oncogene homolog)
E03	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
E04	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
E05	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
E06	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
E07	GDF10	growth differentiation factor 10
E08	IBSP	integrin-binding sialoprotein
E09	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
E10	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
E11	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
E12	MGP	matrix Gla protein
F01	MINPP1	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1
F02	MMP13	matrix metalloproteinase 13 (Kollagenase 3)
F03	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV Kollagenase)
F04	MMP8	matrix metalloproteinase 8 (neutrophil Kollagenase)
F05	MSX1	msh homeobox 1
F06	MSX2	msh homeobox 2
F07	DSPP	dentin sialophosphoprotein
F08	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
F09	PHEX	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked
F10	RUNX2	runt-related transcription factor 2
F11	SMAD1	SMAD family member 1
F12	SMAD2	SMAD family member 2
G01	SMAD3	SMAD family member 3
G02	SMAD4	SMAD family member 4
G03	SMAD5	SMAD family member 5
G04	SMAD6	SMAD family member 6
G05	SMAD7	SMAD family member 7
G06	SMAD9	SMAD family member 9
G07	SOST	sclerosteosis
G08	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
G09	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
G10	SPP1	secreted phosphoprotein 1
G11	STATH	statherin
G12	TFIP11	tuftelin interacting protein 11
H01	TGFB1	transforming growth factor, beta 1
H02	TGFB2	transforming growth factor, beta 2
H03	TGFB3	transforming growth factor, beta 3
H04	TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1
H05	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
H06	TUFT1	tuftelin 1
H07	TWIST1	twist homolog 1 (Drosophila)
H08	TWIST2	twist homolog 2 (Drosophila)
H09	VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
H10	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
H11	VEGFB	vascular endothelial growth factor B
H12	VEGFC	vascular endothelial growth factor C

Tabelle 15: komplette Übersicht der Genregulationen des TaqMan® Array „Human Osteogenesis“

Well	Gen	n-fache Induktion des 0d-Wertes oder jeweiligen VK-Wertes									
		3 Tage					14 Tage				
		VK	CBD		OS		VK	CBD		OS	
A05	AHSG	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
A06	ALPL	9,4	10,2	1,1	10,9	1,2	3,1	7,0	2,3	7,7	2,5
A07	AMBN	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
A08	AMELY	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
A09	ARSE	1,1	1,0	0,9	1,7	1,5	0,7	1,0	1,5	1,5	2,2
A10	BGLAP	1,1	1,1	1,0	1,3	1,2	0,7	1,1	1,5	0,4	0,6
A11	BMP1	1,4	1,3	0,9	2,6	1,9	1,6	2,1	1,3	1,0	0,6
A12	BMP2	1,1	0,8	0,8	3,0	2,8	0,7	1,9	2,9	1,3	1,9
B01	BMP3	1,4	1,1	0,8	n. d.	n. d.	6,1	6,6	1,1	n. d.	n. d.
B02	BMP4	9,8	9,4	1,0	35,6	3,6	18,5	38,9	2,1	7,9	0,4
B03	BMP5	2,8	1,5	0,5	1,4	0,5	n. d.	0,4	n. d.	0,6	n. d.
B04	BMP6	3,7	4,8	1,3	1,4	0,4	11,4	9,1	0,8	0,9	0,1
B05	BMP7	2,1	4,9	2,3	1,6	0,8	2,0	9,4	4,7	5,6	2,8
B06	BMPR1A	1,5	1,1	0,7	1,8	1,3	1,9	1,7	0,9	0,8	0,4
B07	CALCR	1,8	1,8	1,0	1,8	1,0	2,0	0,6	0,3	4,8	2,4
B08	CASR	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
B09	CDH11	2,2	2,4	1,1	1,8	0,8	2,5	3,2	1,2	0,6	0,2
B10	COL10A1	6,6	7,5	1,1	1,6	0,2	55,7	35,1	0,6	0,1	0,0
B11	COL11A1	1,2	1,3	1,0	2,8	2,3	3,8	1,8	0,5	0,9	0,2
B12	COL12A1	1,0	1,4	1,4	1,1	1,2	1,8	1,7	0,9	0,5	0,3
C01	COL14A1	16,0	13,9	0,9	1,4	0,1	26,5	36,8	1,4	0,2	0,0
C02	COL15A1	1,3	2,1	1,5	0,2	0,2	1,6	0,9	0,6	0,2	0,1
C03	COL16A1	1,6	2,3	1,5	1,4	0,9	3,9	4,2	1,1	0,5	0,1
C04	COL17A1	1,0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
C05	COL18A1	3,4	4,3	1,3	2,5	0,7	3,6	4,8	1,3	1,4	0,4
C06	COL19A1	7,4	7,8	1,1	6,8	0,9	7,0	12,0	1,7	n. d.	n. d.
C07	COL1A1	1,7	1,3	0,7	0,3	0,2	1,6	1,9	1,2	0,1	0,1
C08	COL1A2	1,1	1,4	1,2	0,5	0,4	1,1	1,4	1,2	0,2	0,2
C09	COL2A1	1,0	0,2	0,2	n. d.	n. d.	n. d.	0,4	n. d.	n. d.	n. d.
C10	COL3A1	1,6	1,5	0,9	0,4	0,3	1,3	1,7	1,4	0,1	0,1
C11	COL4A3	2,1	1,4	0,7	3,5	1,7	20,9	7,3	0,3	6,3	0,3
C12	COL4A4	1,8	2,4	1,3	4,8	2,7	15,5	6,7	0,4	5,2	0,3
D01	COL4A5	2,6	3,5	1,4	2,4	0,9	1,8	2,5	1,4	3,0	1,7
D02	COL5A1	1,5	1,6	1,1	0,6	0,4	2,4	2,8	1,2	0,5	0,2
D03	COL7A1	0,9	1,3	1,4	4,3	4,7	0,4	0,5	1,4	1,6	4,3
D04	COL9A2	1,1	2,1	1,8	2,5	2,3	0,8	1,6	2,1	0,5	0,6
D05	COMP	0,8	1,1	1,4	1,4	1,8	2,7	1,5	0,5	0,5	0,2
D06	CSF2	11,6	21,4	1,9	10,4	0,9	11,5	45,8	4,0	14,5	1,3
D07	CSF3	1,0	1,3	1,2	2,3	2,2	1,0	1,5	1,4	2,7	2,7
D08	DMP1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
D09	EGF	1,0	1,1	1,1	0,8	0,8	1,4	2,0	1,4	1,7	1,2
D10	EGFR	1,7	2,4	1,4	3,2	1,9	1,9	3,0	1,6	2,4	1,3
D11	ENAM	n. d.	1,5	n. d.	n. d.	n. d.	0,3	2,1	8,1	2,2	8,6
D12	FGF1	1,9	2,0	1,0	8,0	4,2	3,4	3,8	1,1	3,8	1,1
E01	FGF2	0,6	0,6	1,0	0,4	0,6	1,1	0,7	0,6	0,3	0,3
E02	FGF3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

		n-fache Induktion des 0d-Wertes oder jeweiligen VK-Wertes									
		3 Tage					14 Tage				
Well	Gen	VK	CBD		OS		VK	CBD		OS	
E03	FGFR1	2,3	2,5	1,1	2,1	0,9	2,1	2,6	1,2	1,8	0,9
E04	FGFR2	0,4	0,5	1,4	0,4	1,2	1,7	1,0	0,6	0,1	0,1
E05	FGFR3	0,3	0,4	1,5	1,2	4,3	0,7	0,6	0,9	1,6	2,2
E06	FLT1	4,5	5,5	1,2	29,3	6,5	5,5	4,4	0,8	9,0	1,6
E07	GDF10	6,0	6,2	1,0	1,0	0,2	4,9	8,1	1,6	0,2	0,0
E08	IBSP	0,1	0,1	0,7	0,0	0,4	0,0	0,1	5,3	n. d.	n. d.
E09	IGF1	9,3	3,9	0,4	3,0	0,3	24,8	21,6	0,9	0,3	0,0
E10	IGF1R	1,6	1,7	1,0	3,5	2,2	1,9	2,1	1,1	2,3	1,2
E11	IGF2	12,0	11,2	0,9	64,0	5,3	86,0	60,7	0,7	27,7	0,3
E12	MGP	9,9	38,6	3,9	66,9	6,8	25,4	62,7	2,5	12,9	0,5
F01	MINPP1	1,7	1,5	0,9	1,8	1,1	1,7	1,4	0,8	1,2	0,7
F02	MMP13	2,8	3,3	1,2	0,7	0,3	1,4	7,2	5,3	0,4	0,3
F03	MMP2	1,8	2,1	1,2	1,6	0,9	2,1	4,0	1,9	0,2	0,1
F04	MMP8	0,9	1,5	1,7	0,6	0,7	0,2	0,1	0,6	0,1	0,4
F05	MSX1	1,9	2,4	1,2	4,2	2,2	1,9	4,1	2,2	4,3	2,3
F06	MSX2	1,6	1,9	1,2	2,4	1,5	1,3	2,0	1,5	1,9	1,5
F07	DSPP	n. d.	2,3	n. d.	1,5	n. d.	4,0	0,7	0,2	5,3	1,3
F08	PDGFA	2,0	2,3	1,2	1,0	0,5	3,8	3,3	0,9	0,9	0,2
F09	PHEX	2,5	1,9	0,8	1,7	0,7	1,4	1,8	1,3	0,6	0,4
F10	RUNX2	1,4	1,1	0,8	2,0	1,4	1,7	1,6	0,9	1,5	0,9
F11	SMAD1	1,7	1,6	0,9	1,1	0,6	1,6	1,7	1,0	0,7	0,5
F12	SMAD2	1,4	1,5	1,1	1,5	1,1	1,5	1,7	1,2	0,9	0,6
G01	SMAD3	1,6	1,7	1,1	1,9	1,2	1,1	1,6	1,4	1,3	1,1
G02	SMAD4	1,7	2,3	1,3	2,1	1,2	1,9	1,9	1,0	1,9	1,0
G03	SMAD5	1,9	1,8	0,9	1,7	0,9	1,5	2,0	1,3	1,3	0,8
G04	SMAD6	0,7	0,9	1,2	1,1	1,5	0,7	1,3	1,8	0,4	0,6
G05	SMAD7	0,7	0,9	1,2	1,0	1,4	0,9	1,1	1,2	0,6	0,7
G06	SMAD9	1,0	1,0	1,1	0,9	1,0	0,9	1,5	1,6	0,4	0,5
G07	SOST	n. d.	n. d.	n. d.	0,1	n. d.	0,1	0,1	1,3	0,7	8,9
G08	SOX9	2,0	1,3	0,7	0,2	0,1	1,8	2,1	1,2	0,1	0,1
G09	SPARC	0,9	1,2	1,3	0,3	0,4	2,3	2,3	1,0	0,2	0,1
G10	SPP1	2,1	0,7	0,3	4,5	2,1	1,1	2,1	1,8	0,9	0,8
G11	STATH	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	7,1	n. d.
G12	TFIP11	1,2	1,2	1,0	1,5	1,3	1,5	1,6	1,1	1,5	1,0
H01	TGFB1	0,8	0,9	1,0	0,5	0,6	0,8	0,7	0,9	0,6	0,8
H02	TGFB2	3,5	3,9	1,1	1,5	0,4	3,8	4,2	1,1	4,5	1,2
H03	TGFB3	2,6	2,9	1,1	1,5	0,6	5,2	5,9	1,1	0,4	0,1
H04	TGFBR1	1,6	1,7	1,1	1,4	0,9	2,4	2,5	1,0	1,2	0,5
H05	TGFBR2	2,2	2,1	1,0	4,5	2,1	2,0	2,6	1,3	2,4	1,2
H06	TUFT1	3,7	9,5	2,6	1,4	0,4	4,6	2,2	0,5	0,8	0,2
H07	TWIST1	1,2	1,6	1,3	3,3	2,9	1,6	1,5	0,9	2,1	1,3
H08	TWIST2	0,9	0,9	1,0	4,5	4,9	1,2	1,2	1,0	9,9	8,1
H09	VDR	1,2	1,8	1,5	2,0	1,6	1,5	1,7	1,2	1,0	0,7
H10	VEGFA	1,2	1,1	0,9	0,5	0,4	1,5	0,8	0,5	0,8	0,5
H11	VEGFB	2,4	4,2	1,8	4,3	1,8	4,8	6,5	1,4	1,6	0,3
H12	VEGFC	1,1	1,2	1,1	1,7	1,5	1,2	1,3	1,1	0,6	0,5

Selbstständigkeitserklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 22.10.2015

Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei Herr Prof. Dr. Hinz, Frau PD Dr. Peters und Herr Dr. Ramer für die Vergabe dieses spannenden Promotionsthemas bedanken.

Herr Prof. Burkhard Hinz danke ich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und die Begutachtung und Durchsicht meiner Dissertation, sowie die Bereitstellung eines Großteils meiner Arbeitsmittel.

Herr Dr. Robert Ramer möchte ich für seine wissenschaftliche Betreuung, seine unerschöpflichen Ideen, seine Begeisterung und die praktische Unterstützung bei den Migrationsanalysen danken.

Frau PD Dr. Kirsten Peters verdanke ich die Möglichkeit zur Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen und den anderen nicht unerheblichen Teil der finanziellen Unterstützung. Zudem hat sie mir jederzeit wissenschaftlich, aber auch moralisch, zur Seite gestanden.

Herr Prof. Dr. Dieter Weiss danke ich für die Durchsicht und Begutachtung meiner Arbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Stefanie Adam und Astrid Röhring, welche mich in die meisten der hier angewendeten Methoden eingeführt und unermüdlich im Labor unterstützt haben.

Meinem Kollegen Dr. Achim Salamon möchte ich für seine stets großzügige Hilfe bei technischen, methodischen und statistischen Fragen danken.

Ohne meine Freundin und Kollegin Juliane Meyer wäre ich wohl nie auf dieses Kooperationsprojekt gestoßen - und nur mit wenigen Menschen kann man stundenlang zusammen an der Bench arbeiten ohne den Spaß zu verlieren oder die Zellkulturen zu kontaminieren. Danke!

Da man auch immer wissenschaftliche und persönliche Durststrecken in seiner Promotion überstehen muss, ist eine gute Atmosphäre unter den Kollegen umso wichtiger. Wenn nicht schon oben geschehen, möchte ich mich deshalb unbedingt bei Katharina Heinemann, Philipp Borchert, Katharina Bublitz, Nadine Mittag, Antje Zimmermann, Maria Haustein, Nicole Herzmann und Janine Wetzel für die gute Stimmung und die schöne Zeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre große Unterstützung - ob nun aus der Ferne oder der Nähe, und die Gewissheit, dass sich dies nie ändern wird...

Abschließend danke ich Dir, Marian, für deine Liebe und stete Unterstützung – während der Promotion, jetzt und in unserer gemeinsamen Zukunft...